

**MIRELLA ALVES DA CUNHA**

**Frequência da infecção por *Leishmania* spp. em pacientes com HIV/aids vivendo em área urbana**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo para obtenção do  
título de Doutor em Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias  
Orientador: Dr. José Angelo Lauletta Lindoso

**SÃO PAULO  
2017**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Cunha, Mirella Alves da

Frequência da infecção por *Leishmania* spp. em pacientes com HIV/AIDS  
vivendo em área urbana / Mirella Alves da Cunha. -- São Paulo, 2017.  
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.  
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Descritores: 1.Leishmaniose visceral 2.Leishmaniose 3.HIV 4.Síndrome de  
imunodeficiência adquirida 5.Coinfecção 6.Diagnóstico

USP/FM/DBD-061/17

**Dedicatória**

---

A Deus, aos meus amigos, professores e à minha família.

## **Agradecimientos**

---

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado saúde física e mental para realizar todos os meus objetivos.

Ao meu orientador, José Angelo Lauletta Lindoso, pela paciência, compreensão e, sobretudo, pelo apoio em todos os momentos.

À Doutora Hiro Goto e ao Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, pela colaboração na execução nas diversas fases do projeto.

A Beatriz Julieta Celeste, Norival Kesper Júnior, Mahyumi Fujimori, Renata Silva e Daiane Dias, pela ajuda na execução dos métodos laboratoriais.

À Doutora Zulma Medeiros e toda equipe do Departamento de Parasitologia da Fundação Oswaldo Cruz/Pernambuco, pela disponibilidade e apoio para realização de parte dos experimentos.

Aos funcionários e residentes do Instituto de Infectologia Emílio Ribas, pelo apoio na inclusão de pacientes e coleta de amostras.

Ao setor de coleta de exames do Instituto de Infectologia Emílio Ribas, pelo apoio fundamental para execução desta etapa.

Às secretárias do Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, Roseli e Letícia, pela ajuda de sempre.

Aos componentes da banca do Exame de Qualificação, Dra. Carmen Sanches, Dra. Cláudia Gomes e Dr. Ronaldo Gryschek, pela contribuição no trabalho e pela disponibilidade em todos os momentos.

Aos professores e funcionários do Departamento de Infectologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, que me deram as bases teóricas e me apoiaram, mesmo à distância, para a realização dessa conquista.

Ao corpo clínico do Hospital Giselda Trigueiro, Natal/RN, pelos ensinamentos médicos e de vida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro ao projeto (Processo 2015/06535-9).

A André Pantaroto, pelo apoio incondicional em todas as fases deste projeto.

Aos amigos Ariane Melaré Ramos dos Santos e Filipe Teixeira Piastrelli.

**Epígrafe**

---

*“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”*

*(José de Alencar)*



**Normatização adotada**

---

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento de sua publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L.Freddi, Maria F.Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviatura dos títulos e periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

## **Sumário**

---

---

	<b>Lista de abreviaturas e siglas</b>	
	<b>Lista de tabelas</b>	
	<b>Lista de figuras</b>	
	<b>Lista de gráficos</b>	
	<b>Resumo</b>	
	<b>Abstract</b>	
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1	Aspectos gerais sobre Leishmaniose.....	2
1.2	Vírus da imunodeficiência humana, infecção pelo HIV e aids.....	5
1.3	Diagnóstico da Leishmaniose Visceral.....	5
1.4	Perspectiva geral da coinfeção <i>Leishmania</i> /HIV.....	9
1.5	Diagnóstico da coinfeção <i>Leishmania</i> /HIV.....	11
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>14</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
3.1	Objetivo Geral.....	17
3.2	Objetivo Específicos.....	17
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>18</b>
4.1	Delineamento do estudo.....	19
4.2	Local do estudo.....	19
4.3	Cálculo amostral.....	20
4.4	Sujeitos da pesquisa.....	20
4.5	Fonte de dados.....	22
4.6	Coleta e processamento das amostras.....	23
4.7	Técnicas laboratoriais.....	24
4.7.1	Métodos sorológicos.....	24
4.7.1.1	ELISA usando antígeno total de <i>Leishmania major</i> -like (ELISA <i>L. major</i> -like)	24
4.7.1.2	ELISA usando extrato antigênico total de <i>Leptomonas seymori</i> (ELISA <i>Leptomonas</i> ).....	25
4.7.1.3	ELISA usando antígeno recombinante K39 (ELISA rk39).....	26
4.7.1.4	ELISA usando antígeno recombinante K28 (ELISA rk28).....	27
4.7.1.5	Imunofluorescência indireta com antígeno <i>Leishmania major</i> -like (RIFI).....	28
4.7.1.6	Teste de aglutinação direta (DAT).....	29
4.7.2	Métodos moleculares.....	31

---

4.7.2.1	Extração de DNA.....	31
4.7.2.2	Reação em cadeia da polimerase – alvo kDNA.....	31
4.7.2.3	Reação da Cadeia da Polimerase – alvo ITS-1.....	32
4.8	Análise estatística.....	33
4.9	Considerações sobre questões éticas da pesquisa.....	34
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>35</b>
5.1	Resultados gerais.....	36
5.2	ELISA <i>L. major</i> -like.....	47
5.3	ELISA <i>Leptomonas</i> .....	50
5.4	ELISA rK39.....	54
5.5	ELISA rK28.....	56
5.6	Reação de imunofluorescência indireta.....	58
5.7	Teste de aglutinação direta – DAT.....	62
5.8	Reação em cadeia da polimerase – alvo kDNA (PCR k-DNA).....	62
5.9	Reação em cadeia da polimerase – ITS-1(PCR ITS-1).....	64
5.10	Concordância entre os testes diagnósticos.....	67
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>73</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>95</b>
<b>8</b>	<b>LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....</b>	<b>97</b>
<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>99</b>

**Listas**

---

<b>LV</b>	Leishmaniose Visceral
<b>HIV</b>	Vírus da Imunodeficiência Humana
<b>CDC</b>	<i>Centers for disease control and prevention</i>
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<b>RIFI</b>	Reação de imunofluorescência indireta
<b>DAT</b>	Teste de aglutinação direta
<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i>
<b>kDNA</b>	<i>kinetoplastid DNA</i>
<b>ITS-1</b>	<i>internal transcribed spacer 1</i>
<b>USP</b>	Universidade de São Paulo
<b>IMT</b>	Instituto de Medicina Tropical de São Paulo
<b>TARV</b>	Terapia antirretroviral
<b>PBS</b>	<i>phosphate-buffered saline</i>
<b>TMB</b>	tetrametilbenzidina
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucleico

---

<b>Tabela 1</b>	Distribuição de 240 pacientes vivendo com HIV/aids acompanhados no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril/2015 a março/2016) incluídos, segundo estado de nascimento.....	38
<b>Tabela 2</b>	Distribuição de 240 pacientes vivendo com HIV/aids acompanhados no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril/2015 a março/2016) quanto ao uso regular de TARV e uso de esquema antiretroviral contendo inibidor de protease.....	39
<b>Tabela 3</b>	Distribuição de 240 pacientes vivendo com HIV/aids atendidos no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril/2015 a março/2016) quanto aos valores de carga viral.....	41
<b>Tabela 4</b>	Distribuição de 240 pacientes vivendo com HIV/aids acompanhados no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril/2015 a março/2016) incluídos em relação à presença das alterações laboratoriais: anemia, leucopenia, plaquetopenia e pancitopenia.....	42
<b>Tablea 5</b>	Distribuição dos pacientes com sintomas característicos de LV (18 pacientes no total) em relação à presença das alterações laboratoriais: anemia, leucopenia, plaquetopenia.....	43
<b>Tabela 6</b>	Distribuição das comorbidades mais prevalentes citadas pelos 240 pacientes vivendo com HIV/aids atendidos no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril/2015 a março/2016).....	44
<b>Tabela 7</b>	Distribuição de 240 pacientes vivendo com HIV/aids acompanhados no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril/2015 a março/2016) em relação à presença de infecções oportunistas prévias e proporção de pacientes que tiveram mais de uma infecção oportunista relatada, em relação ao total de pacientes.....	46
<b>Tabela 8</b>	Distribuição dos pacientes vivendo com HIV/aids acompanhados no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril/2015 a março/2016) em relação à positividade dos métodos diagnósticos de leishmaniose.....	47



---

<b>Tabela 9</b>	Características associadas à reatividade do teste ELISA <i>L. major</i> -like em 240 pessoas vivendo com HIV/aids atendidos no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril de 2015 a março de 2016) .....	48
<b>Tabela 10</b>	Características associadas à reatividade do teste ELISA <i>Leptomonas</i> em 240 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril de 2015 a março de 2016).....	58
<b>Tabela 11</b>	Características associadas à reatividade do teste ELISA rK39 em 240 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril de 2015 a março de 2016).....	55
<b>Tabela 12</b>	Características associadas à reatividade do teste ELISA rK28 em 240 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril de 2015 a março de 2016).....	57
<b>Tabela 13</b>	Características associadas à reatividade do teste RIFI em 240 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril de 2015 a março de 2016).....	60
<b>Tabela 14</b>	Características associadas à positividade da PCR k-DNA em 240 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril de 2015 a março de 2016).....	63
<b>Tabela 15</b>	Características associadas à positividade da PCR k-DNA em 240 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril de 2015 a março de 2016).....	64
<b>Tabela 16</b>	Concordância entre os testes diagnósticos realizados nas 240 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril de 2015 a março de 2016): ELISA <i>L. major</i> -like em relação à ELISA <i>Leptomonas</i> , ELISA rK39, ELISA rK28, RIFI, PCR kDNA, PCR ITS-1.....	68
<b>Tabela 17</b>	Concordância entre os testes diagnósticos realizados nas 240 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril de 2015 a março de 2016): RIFI	

---

	em relação à ELISA <i>Leptomonas</i> , ELISA rK39, ELISA rK28, PCR kDNA, PCR ITS-1.....	69
<b>Tabela 18</b>	Concordância entre os testes diagnósticos realizados nas 240 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril de 2015 a março de 2016): ELISA <i>Leptomonas</i> em relação à ELISA rK39, ELISA rK28, PCR kDNA, PCR ITS-1.....	70
<b>Tabela 19</b>	Concordância entre os testes diagnósticos realizados nas 240 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril de 2015 a março de 2016): ELISA rK39 em relação à ELISA rK28, PCR kDNA e PCR ITS-1.	71
<b>Tabela 20</b>	Concordância entre os testes diagnósticos realizados nas 240 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril de 2015 a março de 2016): ELISA rK28 em relação à PCR kDNA e PCR ITS-1.....	71
<b>Tabela 21</b>	Concordância entre os testes diagnósticos realizados nas 240 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril de 2015 a março de 2016): PCR kDNA em relação à PCR ITS-1.....	72

<b>Figura 1</b>	Fórmula utilizada no cálculo amostral.....	20
<b>Figura 2</b>	Configuração da placa de DAT. Linhas representadas por letras e colunas representadas por números. Em destaque, localização do controle positivo e do “branco”.....	30
<b>Figura 3</b>	Eletroforese em Gel de agarose 1% com os produtos amplificados do minicírculo do kDNA com 720pb. pb: peso molecular (100 pb); 034 a 049: amostras de pacientes; (-): controle negativo; (+): controle positivo: DNA de promastigota de <i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i> .....	62
<b>Figura 4</b>	Eletroforese em Gel de agarose 2% com os produtos amplificados do ITS-1 com 300-350pb. M: peso molecular (100 bp); Amostras 169, 170, 171, 173, 174, 175, 176, 178, 179, 180, 181, 182, 184, 185. CP: controle positivo (DNA de promastigota de <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i> ); CN: controle negativo.....	67

<b>Gráfico 1</b>	Distribuição dos 240 pacientes vivendo com HIV/aids, atendidos no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril/2015 a março/2016) segundo o gênero.....	36
<b>Gráfico 2</b>	Distribuição de 240 pacientes vivendo com HIV/aids atendidos no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril/2015 a março/2016) segundo presença de epidemiologia para leishmaniose visceral.....	37
<b>Gráfico 3</b>	Boxplot da distribuição do tempo de diagnóstico (anos) da infecção pelo HIV dos 240 pacientes vivendo com HIV/aids atendidos no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril/2015 a março/2016).....	37
<b>Gráfico 4</b>	Boxplot demonstrando a distribuição do valor da contagem de linfócitos T CD4+ dos 240 pacientes vivendo com HIV/aids acompanhados no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril/2015 a março/2016).....	39
<b>Gráfico 5</b>	Distribuição de 240 pacientes vivendo com HIV/aids atendidos no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril/2015 a março/2016) categorizados de acordo com a contagem de linfócitos T CD4+ (em células/mm <sup>3</sup> ).....	40
<b>Gráfico 6</b>	Distribuição de 240 pacientes vivendo com HIV/aids atendidos no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril/2015 a março/2016) quanto à ausência de detecção de cópias de HIV-1 em sangue periférico (células/mm <sup>3</sup> ).....	41
<b>Gráfico 7</b>	Distribuição de 240 pacientes vivendo com HIV/aids atendidos no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril/2015 a março/2016) incluídos em relação à presença ou não de sintomas considerados compatíveis com LV.....	42
<b>Gráfico 8</b>	Distribuição de 240 pacientes vivendo com HIV/aids atendidos no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril/2015 a março/2016) incluídos em relação à presença de comorbidades	44
<b>Gráfico 9</b>	Distribuição de 240 pacientes vivendo com HIV/aids atendidos	

	no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril/2015 a março/2016), categorizados pela reatividade de ELISA L. major-like e valor de contagem de linfócitos T CD4+ (células/mm <sup>3</sup> ).....	50
<b>Gráfico 10</b>	Distribuição de 240 pacientes vivendo com HIV/aids atendidos no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril/2015 a março/2016), categorizados pela reatividade de ELISA L. major-like e uso de terapia antirretroviral.....	50
<b>Gráfico 11</b>	Boxplot da distribuição dos valores de contagem de linfócitos T CD4+ dos 240 pacientes vivendo com HIV/aids acompanhados no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril/2015 a março de 2016), em relação à reatividade para ELISA Leptomonas.....	53
<b>Gráfico 12</b>	Distribuição de 240 pacientes vivendo com HIV/aids acompanhados no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril/2015 a março de 2016), categorizados pela reatividade de ELISA Leptomonas e valor de contagem de linfócitos T CD4+ (células/mm <sup>3</sup> ).....	54
<b>Gráfico 13</b>	Distribuição de 240 pacientes vivendo com HIV/aids atendidos no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril/2015 a março/2016), categorizados pela reatividade de RIFI e valor de contagem de linfócitos T CD4+ (células/mm <sup>3</sup> ).....	61
<b>Gráfico 14</b>	Distribuição de 240 pacientes vivendo com HIV/aids atendidos no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril/2015 a março/2016), categorizados pela reatividade de RIFI e presença de histórico de tuberculose.....	61

**Resumo**

---

Cunha MA. Frequência da infecção por *Leishmania* spp. em pacientes com HIV/aids vivendo em área urbana [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

Introdução: coinfeção *Leishmania*/HIV representa um grande problema de saúde visto que há maior recidiva e letalidade por leishmaniose visceral na população de pacientes vivendo com HIV/aids. No entanto, pouco se sabe a respeito da frequência da infecção por *Leishmania* em pacientes assintomáticos com HIV, que podem futuramente desenvolver doença plenamente manifesta. Ademais poucas informações sobre o desempenho dos métodos de diagnóstico laboratorial de leishmaniose em pacientes coinfectados estão disponíveis no Brasil e na América Latina. Objetivos: avaliar a frequência da infecção por *Leishmania* spp. em pacientes com HIV/aids em uma coorte de São Paulo/SP, a positividade dos métodos sorológicos e moleculares em pacientes com HIV/aids e as possíveis associações da positividade dos diferentes métodos laboratoriais com variáveis clínicas, laboratoriais e epidemiológicas. Material e métodos: estudo transversal, realizado com pacientes atendidos no Instituto de Infectologia Emílio Ribas com diagnóstico de infecção pelo HIV. A amostra foi calculada com base na prevalência da infecção por *Leishmania* spp. em pacientes com HIV/aids, estimada em estudos prévios. Foram incluídos 240 pacientes nesta amostragem, os quais foram submetidos à coleta de sangue periférico em dois tubos: um tubo seco para análise sorológica; um tubo contendo EDTA, para o diagnóstico molecular. As amostras foram submetidas aos seguintes testes diagnósticos: ELISA usando antígenos de *L. major*-like (ELISA *L. major*-like); ELISA usando antígenos de *Leptomonas seymouri* (ELISA *Leptomonas*); ELISA usando antígenos rk39 (ELISA rK39); ELISA usando antígenos rK28 (ELISA rK28); Reação de imunofluorescência indireta (RIFI); Teste de Aglutinação Direta (DAT); Reação em cadeia da polimerase (PCR) com os seguintes genes alvos: kDNA (PCR kDNA) e ITS-1 (PCR ITS-1). Resultados: a frequência, levando-se em consideração a positividade em pelo menos um dos métodos empregados, foi de 34,6%. Sessenta pacientes (25%) foram positivos para ELISA *L. major*-like; nove (3,8%) para ELISA *Leptomonas*; três (1,3%) para ELISA rK39; seis (2,5%) para ELISA rK28; onze (4,6%) para RIFI; quatro (1,7%) para PCR

kDNA; 10 (4,2%) para PCR ITS-1. Nenhuma amostra foi positiva para DAT. Não houve associação da positividade dos testes com contato com área endêmica para LV ou presença de sintomas sugestivos de LV. Para ELISA *L.major-like*, ELISA *Leptomonas* e RIFI, houve associação entre valores de contagem de linfócitos T CD4+ e positividade dos testes. Conclusões: Houve uma alta prevalência da infecção por *Leishmania* spp. em pacientes infectados pelo HIV na amostra estudada, principalmente utilizando-se ELISA com antígeno total de *L. major-like*. Apesar de existir a possibilidade de reação cruzada com outros antígenos que possam ter influenciado na positividade de alguns testes, especialmente ELISA *L. major-like*, outros testes considerados altamente específicos para o diagnóstico de infecção por *Leishmania* também se apresentaram positivos, o que pode demonstrar a magnitude da coinfeção *Leishmania*/HIV na amostra estudada. Houve associação entre positividade de alguns testes estudados e os valores de linfócitos T CD4+, com maior positividade destes testes em pacientes mais imunodeprimidos. Presença de sintomatologia ou epidemiologia para LV não tiveram influência na positividade dos testes diagnósticos.

Descritores: Leishmaniose Visceral; leishmaniose; HIV; Síndrome da Imunodeficiência Adquirida; Coinfeção; Diagnóstico.



**Abstract**

---

Cunha MA. Frequency of *Leishmania* spp. infection among HIV-infected patients living in an urban area [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2017.

**Introduction:** *Leishmania*/HIV coinfection represents a major health problem since there is greater relapse and lethality due to visceral leishmaniasis in HIV infected population. However, there are few information about the frequency of *Leishmania* infection in asymptomatic HIV infected individuals, who may develop full-blown symptomatic disease in the future. In addition, few information about the performance of laboratory diagnostic methods for leishmaniasis in coinfecting patients are available in Brazil and Latin America. **Objectives:** The main objective is evaluate the frequency of *Leishmania* spp. infection in HIV infected patients in a patient cohort from São Paulo/SP. This study also aims to evaluate the positivity of the serological and molecular methods in HIV/AIDS patients and the possible associations of the positivity of the different laboratory methods regarding to clinical, laboratory and epidemiological variables. **Material and methods:** a cross-sectional study including HIV infected patients treated at Institute of Infectious Diseases Emilio Ribas. The sample was calculated considering the frequency of *Leishmania* spp. infection in HIV infected patients estimated in previous studies. Two hundred and forty patients were included, whose were submitted to peripheral blood collection in two tubes: a dry tube for serological analysis; a tube containing EDTA, for molecular diagnosis. The samples were submitted to the following diagnostic tests: ELISA using *L. major*-like antigens (ELISA *L. major*-like); ELISA using *Leptomonas seymouri* antigens (ELISA *Leptomonas*); ELISA using rk39 antigens (ELISA rK39); ELISA using rK28 antigens (ELISA rK28); indirect fluorescent-antibody test (IFAT); direct agglutination test (DAT); polymerase chain reaction (PCR) with the following target genes: kDNA (kDNA PCR) and ITS-1 (ITS-1 PCR). **Results:** the frequency considering at least one test positive was 34.6%. Sixty patients (25%) were positive by ELISA *L. major*-like; nine (3.8%) by ELISA *Leptomonas*; three (1.3%) by ELISA rK39; six (2.5%) by ELISA rK28; eleven (4.6%) by IFAT; four (1.7%) by kDNA PCR; 10 (4.2%) by ITS-1 PCR. No sample was positive by DAT. There was no association between the positivity of the tests and history of having lived in a VL

transmission area or presence of symptoms suggestive of VL. For ELISA *L.major*-like, ELISA *Leptomonas* and IFAT, there was an association between CD4+ T-lymphocyte counts and test positivity. Conclusions: there was a high prevalence of *Leishmania* spp. in HIV-infected patients included, mainly using ELISA with total *L. major*-like antigen. Although there is a possibility of cross-reaction with other antigens that can influence the positivity of some tests, especially ELISA *L. major*-like, other tests considered to be highly specific for the diagnosis of *Leishmania* infection were also positive, which may demonstrate the magnitude of *Leishmania*/HIV coinfection in the sample studied. There was an association between the positivity of some tests studied and the values of T CD4+ lymphocytes, with a higher positivity of these tests in more immunosuppressed patients. Presence of symptoms or epidemiology for VL had no influence on the positivity of the diagnostic tests.

Descriptors: Leishmaniasis, visceral; Leishmaniasis; HIV; Acquired immunodeficiency syndrome; Coinfection; Diagnosis.

# **1. Introdução**

---

## 1.1 Aspectos gerais sobre *Leishmaniose*

As leishmanioses afetam principalmente a população de países em desenvolvimento, das regiões tropicais e subtropicais, sendo estimados dois milhões de casos novos a cada ano, com mais de 350 milhões de pessoas vivendo em áreas de risco de transmissão, no mundo (McGwire e Satoskar, 2014). O termo leishmaniose do “Velho mundo” refere-se às formas clínicas presentes na África, Ásia, Oriente Médio e Mediterrâneo, cujos vetores são do gênero *Phlebotomus*. Vetores do gênero *Lutzomyia* são os transmissores da doença no “Novo mundo”, região que compreende as áreas endêmicas de toda a América (World health organization, 2010). No Brasil, duas espécies estão relacionadas com a transmissão da espécie de *Leishmania* causadora de leishmaniose visceral: *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*, sendo a primeira considerada a principal espécie transmissora no Brasil, com distribuição ampla pelo território nacional (Manual LV MS 2014).

As leishmanioses são doenças infecciosas causadas por protozoários do gênero *Leishmania* pertence à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. Pelo menos 20 espécies podem causar doenças em humanos, cujas manifestações clínicas variam de lesões cutâneas localizadas até doença sistêmica fatal. As espécies *Leishmania (Leishmania) donovani* e *Leishmania (Leishmania) infantum* (nas Américas, *Leishmania infantum chagasi*) são consideradas “viscerotrópicas”, enquanto todas as outras espécies são consideradas “dermatotrópicas”. No Brasil, foram identificadas seis espécies causadoras de leishmaniose tegumentar: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) shawi*,

*Leishmania (Viannia) naiffi*, *Leishmania (Viannia) lainsoni* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. (Manual LTA MS 2014). As espécies causadoras da leishmaniose visceral (LV) no mundo apresentam distribuição geográfica distinta, sendo que *L. donovani* é encontrada no subcontinente Indiano e Leste da África e tem transmissão predominantemente antroponótica, enquanto a *L. infantum* ocorre na Europa (região do Mediterrâneo) e nas Américas – *L. (L.) infantum chagasi* - e tem como característica a transmissão zoonótica, em que o cão é o principal reservatório no ciclo de transmissão urbano e periurbano (Pace, 2014).

Com relação às formas clínicas, três síndromes clínicas principais podem ser distinguidas: cutânea, mucosa e visceral. (McGwire e Satoskar, 2014). As formas cutâneas se destacam por um grande espectro de manifestações clínicas, variando de lesões cutâneas localizadas até a forma difusa da doença, a depender da imunidade do hospedeiro e da espécie de *Leishmania* envolvida. Pápulas, nódulos e úlceras estão entre as lesões mais descritas. Comprometimento mucoso é relacionado à presença da doença no “Novo mundo”, sendo a espécie mais envolvida *Leishmania (Viannia) braziliensis* e caracteriza-se principalmente por eritema e ulcerações da mucosa nasal e oral (Murray *et al.*, 2005).

Em relação à forma visceral da doença, os principais sintomas incluem febre, hepatoesplenomegalia, astenia e perda de peso, geralmente com curso insidioso que pode progredir de semanas a meses. Anemia, leucopenia, plaquetopenia, hipoalbuminemia e hipergamaglobulinemia estão entre os achados laboratoriais mais frequentes (Murray *et al.*, 2005; Van Griensven e Diro, 2012). Linfadenopatia, incomum na maioria das localidades, é um sinal

observado com maior frequência no Sudão (Pace, 2014). O desfecho clínico é multifatorial e depende de fatores relacionados ao parasito, como patogenicidade e capacidade de invasividade, da resposta imune do hospedeiro e do estado nutricional do indivíduo afetado (Murray *et al.*, 2005; Van Griensven e Diro, 2012). Fatores como infecções bacterianas secundárias e infecção pelo HIV influenciam na mortalidade pela doença (Druzian *et al.*, 2015).

Nas Américas, a LV ocorre em seis países prioritários, sendo que 90% dos casos ocorrem no Brasil, presente em 22 dos 27 estados da federação e nas cinco regiões, com aproximadamente 1600 municípios apresentando transmissão autóctone (Brasil, 2011). A doença tinha um caráter eminentemente rural, porém, nas últimas décadas vem se expandindo para áreas urbanas de médio e grande porte (Harhay *et al.*, 2011). Na década de 1990, aproximadamente 90% dos casos ocorriam na Região Nordeste. À medida que a doença se expandiu para as outras regiões e atinge áreas urbanas e periurbanas, esta situação veio se modificando ao longo do tempo. No período de 2000 a 2002, a região nordeste já representa uma redução para 77% dos casos do país (Manual LV MS 2014). Na região sudeste, a LV ocorre de forma autóctone nos quatro estados. No estado de São Paulo houve reintrodução da LV a partir do final da década de 90 (1998) com registro dos primeiros casos autóctones nos municípios de Araçatuba e Birigui, sendo que a doença se expandiu a partir da região noroeste e atualmente há registro de autoctonia de LV humana em 75 municípios. Não há registro de transmissão autóctone na cidade de São Paulo (Rangel *et al.*, 2013).

## 1.2 Vírus da imunodeficiência humana, infecção pelo HIV e aids.

Até o ano de 2015, existiam aproximadamente 36,7 milhões de indivíduos vivendo com HIV/aids em todo mundo, com cerca de 1,1 milhões de mortes relacionadas à infecção pelo HIV (UNAIDS, 2016). Desde o início da epidemia de aids no Brasil até 2015, haviam sido notificados quase 800.000 casos da doença no Brasil (Boletim epidemiológico, 2015).

O diagnóstico da infecção pelo HIV é realizado através de testes imunológicos e/ou a presença de cópias do vírus detectadas pela carga viral. No acompanhamento do paciente infectado pelo HIV, a contagem de linfócitos T CD4+ é um indicador do *status* imunológico e quanto maior esse valor, melhor a condição imune frente ao HIV e doenças oportunistas (Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos, 2015). Para definição de um caso de aids, além da evidência laboratorial, o indivíduo deve apresentar imunodepressão avançada (contagem de linfócitos T CD4+ menor que 350 células/mm<sup>3</sup>) ou diagnóstico de alguma infecção oportunista listadas no critério “CDC adaptado” do Ministério da Saúde do Brasil (Brasil, 2004). Até o momento, a LV não é considerada doença definidora de aids de acordo com normas internacionais do *Centers for disease control and prevention* (CDC), e do Ministério da Saúde do Brasil (Brasil, 2004).

## 1.3 Diagnóstico da *Leishmaniose Visceral*

O diagnóstico de LV pode ser realizado através de métodos parasitológicos e sorológicos. O diagnóstico parasitológico continua sendo o



“padrão-ouro” para o diagnóstico de LV, devido a sua alta especificidade. A presença de *Leishmania* spp. pode ser determinada principalmente através de aspirado de medula óssea ou esplênico e coloração pelo método de Giemsa, sendo a sensibilidade do aspirado de medula óssea de cerca de 60 a 85% (Srivastava *et al.*, 2011; Elmahallawy *et al.*, 2014). O aspirado de baço apresenta sensibilidade maior (93%), mas é um procedimento que envolve maiores riscos de complicações, incluindo sangramentos. (Srivastava *et al.*, 2011; Van Griensven e Diro, 2012; Elmahallawy *et al.*, 2014).

Os principais métodos sorológicos incluem reação imunoenzimática (ELISA, do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*), reação de imunofluorescência indireta (RIFI), teste de aglutinação direta (DAT) e teste imunocromatográfico (Mary *et al.*, 2006). A sensibilidade depende do antígeno e do método utilizado. A sorologia apresenta limitações para o diagnóstico de doença manifesta, principalmente por não distinguir infecção de doença e por não definir recaída, visto que a positividade pode ocorrer em pessoas de áreas endêmicas sem doença manifesta ou pacientes já curados (Van Griensven e Diro, 2012). No entanto, também por estas características, é um método frequentemente utilizado em inquéritos epidemiológicos e estudos de prevalência de infecção por *Leishmania* (Papadopoulou *et al.*, 2005; Carranza-Tamayo *et al.*, 2009; Gani *et al.*, 2010; Pastor-Santiago *et al.*, 2012).

Em relação ao ELISA, sensibilidade e especificidade dependem do antígeno usado (Elmahallawy *et al.*, 2014). Antígenos brutos de extratos de diversas espécies de *Leishmania* têm sido utilizados para o diagnóstico de LV. ELISA com antígeno de *Leishmania major*-like apresenta sensibilidade próxima de 100% e especificidade variável, a depender do estudo e metodologia

empregada (70 – 100%) (Barbosa-De-Deus *et al.*, 2002; Celeste *et al.*, 2014). Pela similaridade bioquímica, celular e imunológica, outros parasitos não patogênicos para o homem da família Trypanosomatidae tem sido utilizados em métodos diagnósticos para doença de Chagas e leishmaniose. Dentre esses métodos, ELISA com antígenos de *Leptomonas seymouri* demonstrou 100% de sensibilidade quando testado em soros de pacientes com LV, sem diferença estatística em comparação ao ELISA com antígeno de *L. infantum chagasi* (Ferreira *et al.*, 2014). Assim como na maioria das reações com antígenos brutos, observa-se também reação cruzada em soros de pacientes com doença de Chagas e leishmaniose cutânea (Ferreira *et al.*, 2014).

O uso do antígeno recombinante K39 (rK39) de *Leishmania infantum* tem sido avaliado como um método de ótimo desempenho para detecção de LV em atividade. Para reações de ELISA usando este antígeno recombinante, sensibilidade próxima de 100% e especificidade entre 96-100% têm sido relatadas em diversos estudos (Kumar *et al.*, 2001; Srivastava *et al.*, 2011; Elmahallawy *et al.*, 2014). Testes imunocromatográficos usando o antígeno rK39 têm se mostrado também eficazes e de fácil execução, também com alta sensibilidade e especificidade (92,8-100% e 96-98%, respectivamente) (Sundar *et al.*, 1998; Cunningham *et al.*, 2012). Outro antígeno recombinante desenvolvido para o diagnóstico de LV é o antígeno recombinante K28 (rK28). Assim como o rK39, este antígeno pode ser utilizado em reações de ELISA e testes rápidos imunocromatográficos, com alta sensibilidade e especificidade (99,6 e 94,1-100%, respectivamente) para o diagnóstico de LV (Vaish *et al.*, 2012; Mukhtar *et al.*, 2015).

Imunofluorescência indireta (RIFI) é considerado um método sorológico de grande importância em áreas endêmicas, porém requer laboratório equipado para realização, é um método não automatizado, de leitura subjetiva e de difícil execução em áreas de acesso limitado (Iqbal *et al.*, 2002; Boelaert *et al.*, 2004; Srivastava *et al.*, 2011). É um exame indicado pelo Ministério da Saúde do Brasil para o diagnóstico de LV (Manual LV MS 2014), com sensibilidade e especificidade que pode chegar a 90-100% e 98%, respectivamente (Duxbury e Sadun, 1964; Camargo e Rebonato, 1969; Badaro *et al.*, 1983).

O DAT apresenta sensibilidade e especificidade estimadas em 96,9% e 93,7%, respectivamente (Boelaert *et al.*, 2004). Apesar de ser um teste de fácil execução, tem limitações como período para execução relativamente longo, alto custo e produção limitada por poucos laboratórios, além de positividade por longo período mesmo após a cura clínica e entre pessoas assintomáticas vivendo em áreas endêmicas (Chappuis *et al.*, 2006; Srivastava *et al.*, 2011).

Em relação aos métodos moleculares, aqueles baseados em reação em cadeia de polimerase (PCR), têm sido amplamente estudados como alternativas ao diagnóstico sorológico e parasitológico. Além disso, podem ser utilizados para diagnóstico de infecção por *Leishmania* spp. em pacientes ainda sem doença plenamente manifesta, tendo em vista que podem ser positivos em pacientes assintomáticos (Van Griensven e Diro, 2012). Diferentes alvos e espécimes clínicas têm sido utilizadas em amostras de vários tecidos, incluindo baço, medula óssea, sangue periférico e linfonodos (Cota *et al.*, 2012; Jarvis e Lockwood, 2013). De Ruiten *et al.* (2014), em um metanálise a respeito da acurácia diagnóstica dos métodos moleculares, encontraram sensibilidade de

93,1% e especificidade de 95,6%, para estudos avaliando o método em amostras de sangue periférico. Para PCR incluindo amostras de medula óssea, em geral há um incremento desses valores (95,3% de sensibilidade e 95,8% de especificidade). Observa-se grande variedade de alvos utilizados em estudos com objetivos diferentes, o que dificulta a análise de qual alvo molecular seria o mais adequado para o diagnóstico de LV. Dentre esses, destacam-se o uso do minicírculo do cinetoplasto (*kinetoplastid mininicle* DNA – kDNA) e o espaçador interno transcrito 1 (*internal transcribed spacer* – ITS-1) (Brewster *et al.*, 1998; Fraga *et al.*, 2010; Yehia *et al.*, 2012). Ambos podem ser utilizados para rastreio da doença, porém o kDNA é mais amplamente usado, devido à possibilidade de detecção de um grande número de cópias por parasito (De Paiva-Cavalcanti *et al.*, 2015).

#### **1.4 Perspectiva geral da coinfeção *Leishmania*/HIV**

Infecção pelo HIV apresenta também grande importância na América Latina e o número de casos novos permanece estável nessa região, apesar da tendência de queda ao redor do mundo. HIV/aids e LV compartilham mecanismos imunes semelhantes e a coinfeção contribui para a progressão de ambas as doenças (Alvar *et al.*, 1997; Lindoso *et al.*, 2014). A presença do HIV aumenta a fagocitose de *Leishmania* pelos macrófagos e facilita o crescimento intracelular do parasito, com aumento da produção de interleucina-4 e interleucina-10. Além disso, presença de *Leishmania* também favorece a infecção pelo HIV, induzindo a sobrevivência e proliferação de monócitos

infectados, inibindo a apoptose de macrófagos e contribuindo para a elevação da expressão do vírus (Jarvis e Lockwood, 2013; Lindoso *et al.*, 2014). Desse modo, em pacientes com HIV, a LV pode induzir uma maior imunodepressão e estimular a replicação viral, levando o paciente ao desenvolvimento de aids mais rapidamente (Alvar *et al.*, 1997). Portanto, a significância epidemiológica dos infectados assintomáticos aumenta, visto que a coinfeção acelera também o desenvolvimento da LV, se manifestando, principalmente, quando a contagem de linfócitos T CD4+ for abaixo de 200 células/mm<sup>3</sup> (Alvar *et al.*, 1997; Cruz *et al.*, 2006).

O impacto da coinfeção é crescente em várias partes do mundo e tem se mostrado um desafio para o controle da LV, com aumento de casos especialmente em áreas urbanas. No sudoeste europeu, aproximadamente 70% dos casos de leishmaniose visceral são associados com a infecção pelo HIV, principalmente nos usuários de drogas endovenosas (Alvar *et al.*, 1997; Cruz *et al.*, 2006; World health organization, 2010). Esse mesmo cenário também ocorre nos países da América Latina, onde a disseminação da infecção pelo HIV para áreas rurais e a urbanização da LV, contribuem para o cruzamento de áreas de transmissão de ambas as doenças e conseqüentemente para aumento da prevalência da coinfeção (Lindoso *et al.*, 2014; Van Griensven *et al.*, 2014).

Além da importância epidemiológica, coinfeção LV/HIV apresenta-se como fator de mau prognóstico na maioria dos estudos. De forma geral, pacientes com HIV apresentam manifestações clínicas semelhantes àqueles não infectados, incluindo febre, hepatoesplenomegalia e pancitopenia, embora em menor proporção (Lindoso *et al.*, 2014). No entanto, apresentações

atípicas podem estar presentes (Albuquerque *et al.*, 2014). Diarreia, sintoma observado com pouca frequência em pacientes imunocompetentes, é referida em quase metade dos pacientes coinfectedados (Lindoso *et al.*, 2014).

### **1.5 Diagnóstico da coinfeção *Leishmania*/HIV**

Em relação ao diagnóstico, poucas informações sobre o desempenho dos métodos estão disponíveis para pacientes coinfectedados na América Latina. Apesar de reconhecidamente os testes sorológicos apresentarem sensibilidade mais baixa em pacientes com LV clinicamente manifesta infectados pelo HIV, há pouca informação sobre a comparação entre os diversos métodos sorológicos nesse contexto de imunodepressão e poucos estudos que incluam pacientes assintomáticos (Carranza-Tamayo *et al.*, 2009; Cota *et al.*, 2012; Orsini *et al.*, 2012; Lindoso *et al.*, 2014). Em estudo realizado em população de pessoas com HIV/aids acompanhadas em um hospital de nível terciário, no Distrito Federal, foi identificada prevalência de infecção assintomática por *Leishmania* em 16% dos pacientes (Carranza-Tamayo *et al.*, 2009), revelando a importância da coinfeção nesse cenário. Em outro estudo que incluiu 381 pacientes assintomáticos com infecção pelo HIV, foi observada prevalência da infecção por *Leishmania* de 20,2%, para qualquer método positivo (Orsini *et al.*, 2012). Não existem estudos que avaliem essa prevalência no estado de São Paulo.

Comparado com métodos parasitológicos, DAT se apresenta como o teste sorológico de melhor desempenho entre coinfectedados com doença clinicamente manifesta e provenientes de área endêmica, com sensibilidade de

81% e especificidade de 90% (Cota *et al.*, 2012). Para ELISA e RIFI os estudos sobre o desempenho destes métodos em pacientes com HIV são bastante heterogêneos e utilizam diferentes antígenos. Para RIFI, há uma variabilidade de sensibilidade de 11% a 82%, a depender do estudo avaliado, com especificidade em torno de 93%. Para ELISA, os dados são escassos, com sensibilidade estimada de 66% e especificidade de 90% (Cota *et al.*, 2012; Cota *et al.*, 2013). Em relação aos métodos utilizando o antígeno rk39, os estudos demonstram menor sensibilidade (45,6-77%) em comparação a pacientes sem infecção pelo HIV, porém com elevada especificidade (98%) (Ter Horst *et al.*, 2009; Cota *et al.*, 2013).

Considerando que provavelmente a carga parasitária no sangue periférico de pacientes imunossuprimidos é maior, os métodos moleculares podem auxiliar no diagnóstico destes pacientes, com sensibilidade e especificidade em torno de 92% e 96%, respectivamente (Cota *et al.*, 2012). A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido o método molecular mais explorado e diversos alvos têm sido utilizados em estudos com diferentes objetivos, dentre os quais se destacam o DNA do minicírculo do cinetoplasto (*kinetoplastid miminicle DNA* – kDNA) e o espaçador interno transcrito 1 (*internal transcribed spacer* – ITS-1). Além disso, PCR em tempo real através de método quantitativo pode auxiliar no seguimento de pacientes ao quantificar a carga parasitária e reduzir a necessidade de investigações invasivas (Mary *et al.*, 2006; Van Griensven e Diro, 2012). Porém, também existem poucos estudos envolvendo esses métodos de diagnóstico, com dados heterogêneos e diferentes alvos utilizados (Cota *et al.*, 2012).

Devido a estas limitações de estudos que embasem o diagnóstico de LV em pacientes com infecção pelo HIV, procedimentos invasivos, geralmente aspirado de medula óssea para visualização direta de amastigotas de *Leishmania*, são os mais utilizados (Lindoso *et al.*, 2014).



## **2. Justificativa**

---

Pacientes infectados pelo HIV têm maior prevalência de infecção assintomática e poucos estudos têm avaliado a presença de infecção por *Leishmania* nesse grupo, especialmente na América Latina (Cota *et al.*, 2012; Lindoso *et al.*, 2014). Estudos realizados em diferentes localidades consideradas endêmicas para LV, demonstram uma prevalência da infecção assintomática por *Leishmania* spp. variando de 16 a 20,2%. (Carranza-Tamayo *et al.*, 2009; Orsini *et al.*, 2012). Até o momento, não existem trabalhos que avaliem essa frequência em grandes centros urbanos não considerados endêmicos para LV e nenhum estudo que aborde o assunto no Estado de São Paulo.

Além disso, a escolha de métodos diagnósticos para a avaliação da infecção latente por *Leishmania* nesses indivíduos é um desafio e os estudos geralmente usam uma combinação de métodos para essa finalidade. Dessa forma, a prevalência da coinfeção *Leishmania*/HIV no Brasil pode ser subestimada, o que pode refletir diretamente na magnitude da gravidade de doença clinicamente manifesta nesses pacientes.

Neste contexto, e considerando essas informações, este projeto tem por objetivo avaliar a frequência da infecção por *Leishmania* spp. em pacientes com HIV/aids. Para tanto, serão utilizados diferentes métodos laboratoriais para o diagnóstico de LV.

### **3. Objetivos**

---

### **3.1 Geral**

- Determinar a frequência da infecção por *Leishmania* em uma população de pacientes infectados pelo HIV atendidos no Instituto de Infectologia Emílio Ribas, São Paulo, Brasil.

### **3.2 Específicos**

- Avaliar a positividade de diferentes métodos sorológicos e moleculares utilizados no diagnóstico de leishmaniose em pacientes com HIV/Aids;
- Estudar associações entre histórico de contato com área de transmissão de LV e a positividade dos testes empregados;
- Estudar associações entre as características clínicas e laboratoriais (incluindo contagem de linfócitos T CD4+ e uso de terapia antirretroviral) dos pacientes e a positividade dos testes empregados.

## **4. Materiais e Métodos**

#### **4.1 Delineamento do estudo**

Trata-se de estudo transversal, no qual foi avaliada a frequência da infecção por *Leishmania* spp. em pacientes vivendo com HIV/aids. Foram realizados testes sorológicos e moleculares, com ênfase no diagnóstico de infecção por *Leishmania infantum*. A coinfeção *Leishmania*/HIV foi definida quando o paciente apresentou pelo menos um teste diagnóstico positivo.

Informações epidemiológicas, clínicas e laboratoriais foram obtidas com o intuito de estabelecer possíveis associações em relação à positividade dos testes empregados.

#### **4.2 Local do estudo**

O recrutamento de pacientes e a coleta de amostras clínicas foram realizados no Instituto de Infectologia Emílio Ribas, centro de referência para o atendimento de pacientes vivendo com HIV/aids em São Paulo/SP/Brasil. A instituição oferece serviços de ambulatórios em infectologia, especialidades, pronto-atendimento e internação hospitalar. Tem aproximadamente 8.500 pacientes em seguimento ambulatorial e hospitalar.

Os métodos laboratoriais utilizados para o diagnóstico de leishmaniose foram realizados no Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (IMT/USP), no Laboratório de Protozoologia (IMT/USP) e em parceria com o Departamento de Parasitologia da Fundação Oswaldo Cruz / Pernambuco.

### 4.3 Cálculo amostral

Considerando o número de pacientes com HIV/aids atendidos no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (N=8.500), um nível de confiança desejado de 95%, usando como semi-amplitude do intervalo de confiança ou erro máximo aceitável o valor de 5%, e prevalência esperada 16% da coinfeção *Leishmania*/HIV (Carranza-Tamayo *et al.*, 2009), definiu-se o número de 206 pacientes a serem incluídos, a partir da fórmula apresentada na Figura 1.

$$n = \frac{N \cdot Z^2 \cdot P \cdot (1 - P)}{(N - 1) \cdot E^2 + Z^2 \cdot P \cdot (1 - P)}$$

n= tamanho da amostra; N= tamanho do universo; P= prevalência esperada; Z= nível de confiança desejado; E= semi-amplitude do intervalo de confiança ou erro máximo

**Figura 1-** Fórmula utilizada no cálculo amostral

### 4.4 Sujeitos da pesquisa

Foram incluídos neste estudo, pacientes atendidos no Instituto de Infectologia Emílio Ribas, entre abril de 2015 e março de 2016, com diagnóstico de HIV/aids, que foram convidados durante as consultas de rotina ou durante período de internação hospitalar a participarem do projeto de pesquisa. No total, 245 pacientes foram incluídos, sendo 218 pacientes que estavam em acompanhamento ambulatorial e 27 pacientes internados para

tratamento ou investigação de outras doenças. Cinco sujeitos foram excluídos devido a problemas no armazenamento das amostras. Assim, 240 pacientes foram incluídos na análise.

Para fins de informação epidemiológica, “histórico de exposição a áreas de transmissão de LV” foi considerado presente se o paciente nasceu ou viveu por mais de um ano em município com transmissão autóctone de LV (Carranza-Tamayo *et al.*, 2009). Foram considerados municípios com transmissão autóctone de LV aqueles listados nos dados (2001-2014) do sistema de vigilância epidemiológica do Ministério da Saúde do Brasil, nos quais havia pelo menos um caso autóctone de leishmaniose visceral humana.

Foram definidos como “sintomas compatíveis com LV” um dos sintomas incluídos na definição de caso da OMS para LV (febre, esplenomegalia e perda de peso) (World Health Organization, 2010). Em todos os casos, a decisão clínica de realização de outros procedimentos de diagnóstico para leishmaniose, tal como aspirado de medula para pesquisa de *Leishmania* e tratamento específico ficou a cargo da equipe clínica assistente, considerando outros diagnósticos diferenciais possíveis. Os demais pacientes sem sintomas definidos acima foram classificados como “assintomáticos”.

### **Critérios de inclusão**

- Realizar acompanhamento ambulatorial ou estar internado no Instituto de Infectologia Emílio Ribas.
- Diagnóstico confirmado de infecção pelo HIV, segundo fluxograma de diagnóstico do Ministério da Saúde do Brasil (Brasil, 2004).



- Disponibilidade dos resultados de contagem de linfócitos TCD4+ e TCD8+, carga viral e informação de uso ou não de terapia antirretroviral (TARV) até quatro meses anteriores a data da coleta dos exames.
- Maiores de 18 anos.
- Concordância na participação na pesquisa e assinatura do Termo de consentimento livre e esclarecido.

### **Critérios de exclusão**

- Indisponibilidade dos dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais por qualquer motivo.

#### **4.5 Fonte de dados**

Os dados referentes à epidemiologia para LV foram questionados no momento da inclusão dos pacientes no estudo (municípios onde nasceu e morou por mais de um ano). As demais informações foram acessadas através da coleta de dados no prontuário médico e sistema eletrônico de resultados de exames. Foram obtidas as seguintes informações: histórico de tratamento prévio para leishmaniose, intercorrência clínica atual em tratamento, infecções oportunistas prévias, infecções prévias, comorbidades crônicas, sinais e sintomas relacionados à leishmaniose visceral (febre, esplenomegalia e perda de peso), alterações laboratoriais (anemia, leucopenia ou plaquetopenia), regularidade do uso de TARV (conforme definido pela equipe assistente e descrito em prontuário médico), TARV atualmente utilizada, valores da contagem de linfócitos T CD4+, valores de carga viral para HIV-1. Informações

a respeito dos municípios com transmissão autóctone de LV foram obtidas através dos registros do Ministério da Saúde do Brasil.

#### **4.6 Coleta e processamento das amostras**

##### **Coleta das amostras de sangue periférico**

As amostras de sangue foram colhidas juntamente com os outros exames de rotina que são realizados periodicamente, no acompanhamento ambulatorial e de rotina laboratorial dos pacientes internados.

##### **Amostras de sangue periférico**

- a. Soro. Foram colhidos 5 mL de sangue por punção de veia periférica em tubo seco. As amostras foram centrifugadas a 1800 g por 10 minutos para obtenção do soro, os quais foram estocados à -20°C até a realização dos testes sorológicos.
- b. Sangue total. Foram colhidos 10 mL de sangue total por punção de veia periférica em tubo contendo EDTA para extração de DNA para realização de PCR.

## 4.7 Técnicas laboratoriais

### 4.7.1 Métodos sorológicos

Para a técnica de ELISA, foram utilizados quatro diferentes antígenos: *L.major-like*, extrato antigênico total de *Leptomonas seymori*, antígeno recombinante K39 e antígeno recombinante K28.

#### 4.7.1.1 ELISA usando antígeno total de *Leishmania major-like* (ELISA *L. major-like*)

O antígeno total *L. major-like* (MHOM/BR/71/49) (Momen *et al.*, 1985) foi preparado de acordo com descrição de Hoshino-Shimizu e colaboradores, com modificações (Hoshino-Shimizu *et al.*, 1978; Guimaraes *et al.*, 1981; Guimaraes *et al.*, 1983). Placas de poliestireno (Corning incorporated, New York, USA) foram incubadas por 18 h à temperatura de 4°C com 100 µL de antígeno *L. major-like* (5 µg/mL) em tampão carbonato-bicarbonato (0.06M, pH 9.6). Lavagem foi feita três vezes usando tampão fosfato-salino (*phosphate-buffered saline* – PBS) com 0,05% Tween-20 (PBS-T) (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Germany). Cem microlitros de soro por poço diluídos em solução contendo PBS-T e leite desnatado (5%) (1:40) foram adicionados às placas e incubados por 1h a 37 °C. As placas foram então lavadas novamente duas vezes por 10 min com PBS-T, incubadas com conjugado de peroxidase anti-IgG humana cadeia gama específica na diluição de 1:10.000 em PBS-T e leite desnatado 5% por 1 h e então, submetidas a mais um ciclo de lavagens. Após incubação com 100 µL de solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,05%) (Merck-Schuchardt,

Hohenbrunn, Germany) e 0,08 g% de ácido 5-aminosalicílico (Sigma-Aldrich chemical company, St. Louis, USA), por 1h na ausência de luz, a reação foi interrompida pela adição de 30  $\mu$ L de NaOH 1M. Os resultados da reação de ELISA foram lidos no comprimento de onda de 405nm, utilizando um espectrofotômetro (Titertek Multisplan Plus, Helsinki, Finland). O *cutoff* foi determinado a partir da média mais dois desvios-padrões da absorbância dos soros utilizados como controle negativos. Foram considerados como reagentes os soros com valores de absorbância acima do *cutoff*. Cada amostra foi realizada em duplicata e a média foi utilizada para determinar o resultado final. Cada placa continha soros positivos e negativos, como controles.

#### **4.7.1.2 ELISA usando extrato antigênico total de *Leptomonas seymori* (ELISA *Leptomonas*)**

O extrato antigênico de *Leptomonas seymouri* foi preparado de acordo com o descrito por Ferreira et al. (2014). Os parasitos coletados na fase exponencial de crescimento (quarto dia) foram lavados 3 vezes em tampão fosfato 0,01M, pH7,2, contendo NaCl 0,8% (PBS) e centrifugado a 3000 rpm, por 15 minutos a 4°C. O sedimento obtido após a última lavagem foi submetido a dissolução completa com NaOH 0,3M por 18 horas a 4°C sob agitação magnética constante. Em seguida foi realizada a neutralização pela adição de HCl 0,3N e centrifugado a 10.000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi recolhido e após dosagem do conteúdo proteico, os extratos foram armazenados em alíquotas a -70°C até o momento do uso. Para reação de ELISA, placas de poliestireno (Corning incorporated, New York, USA) foram incubadas por 18 h à temperatura de 4°C com 50  $\mu$ L de antígeno (4  $\mu$ g/mL) em

tampão carbonato-bicarbonato (0,05M, pH 9,6). Em seguida, as placas foram lavadas uma vez com PBS-T (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Germany). Após, as placas foram bloqueadas com uma solução contendo PBS-T e 5% de leite desnatado por 30 min em temperatura ambiente. As placas foram então lavadas com PBS-T por cinco vezes e incubadas por 1 h a 37 °C com 50 µL de anti-IgG humano conjugado a peroxidase diluído 1:2.000 em PBS. Após mais um ciclo de lavagens a reação foi revelada pela adição de 50µL de solução contendo: 12,5mL de tampão citrato ácido cítrico 0,05M, pH 5,0; 5mg de *O-phenylenediamine dihydrochloride* (OPD-tablets, Sigma-Aldrich chemical company, St. Louis, USA) e 7,5µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Germany). A reação foi interrompida adicionando-se 25 µL de HCl 4N. Os resultados da reação de ELISA foram obtidos por densidades ópticas no comprimento de onda de 492nm, utilizando um espectrofotômetro (Titertek Multisplan Plus, Helsinki, Finland). O *cutoff* foi determinado pelo valor que demonstrou melhor sensibilidade e especificidade na curva ROC, incluindo controles positivos e negativos. Todos os experimentos foram repetidos independentemente pelo menos duas vezes.

#### **4.7.1.3 ELISA usando antígeno recombinante K39 (ELISA rk39)**

O antígeno recombinante K39 foi obtido do *Infectious Disease Research Institute*, Seattle, WA. Placas de poliestireno (Corning incorporated, New York, USA) foram incubadas por 18h à temperatura de 4 °C com 50 µL de antígeno rk39 (0,5 µg/mL) em tampão carbonato-bicarbonato (0,05M, pH 9,6). Lavagem foi feita três vezes com PBS-T (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn,

Germany). Em seguida, as placas foram bloqueadas com 125 µL por poço de uma solução contendo PBS-T e 5% de leite desnatado por 2h a 37 °C. Após três ciclos de lavagens, 50 µL de soro por poço diluídos em PBS-T e leite desnatado 5% (1:100) foram adicionados às placas e incubados por 30 min a 37 °C. As placas foram então lavadas novamente com PBS-T por cinco vezes, incubadas com conjugado de peroxidase anti-IgG humana (1:30.000 em PBS-T e 5% leite desnatado) por 30 min e então, submetidas a mais um ciclo de lavagens. Para a revelação da reação, utilizou-se o cromógeno tetrametilbenzidina (TMB)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 µL/poço) por 10 minutos e para a interrupção da reação utilizou-se H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N (25 µL/poço). Os resultados da reação de ELISA foram lidos no comprimento de onda de 450nm, utilizando um espectrofotômetro (Titertek Multisplan Plus, Helsinki, Finland). Cada placa tinha controles positivos e negativos. O *cutoff* foi determinado usando a curva ROC. O índice de reatividade foi calculado para cada amostra dividindo o valor da absorbância pelo *cutoff*. Amostras foram consideradas positivas se o valor de índice de reatividade foi  $\geq 1$ .

#### **4.7.1.4 ELISA usando antígeno recombinante K28 (ELISA rk28)**

O antígeno recombinante K28 foi obtido do *Infectious Disease Research Institute*, Seattle, WA. Placas de poliestireno (Corning incorporated, New York, USA) foram incubadas por 18h à temperatura de 4°C com 50 µL de antígeno rk28 (1,0 µg/mL) em tampão carbonato-bicarbonato (0.05M, pH 9.6). Lavagem foi feita três vezes com PBS-T (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Germany). Em seguida, as placas foram bloqueadas com 125 µL por poço de

uma solução contendo PBS-T e 5% de leite desnatado por 2h a 37 °C. Após três ciclos de lavagens, 50 µL de soro por poço diluídos em PBS-T e leite desnatado 5% (1:100) foram adicionados às placas e incubados por 30 min a 37 °C. As placas foram então lavadas novamente com PBS-T por cinco vezes, incubadas com conjugado de peroxidase anti-IgG humana (1:30.000 em PBS-T e 5% leite desnatado) por 30 min e então, submetidas a mais um ciclo de lavagens. Para a revelação da reação, utilizou-se o cromógeno TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 µL/poço) por 10 minutos e para a interrupção da reação utilizou-se H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N (25 µL/poço). Os resultados da reação de ELISA foram lidos no comprimento de onda de 450nm, utilizando um espectrofotômetro (Titertek Multisplan Plus, Helsinki, Finland). Cada placa tinha controles positivos e negativos. O ponto de corte foi determinado usando a curva ROC. O índice de reatividade foi calculado para cada amostra dividindo o valor da absorbância pelo ponto de corte. Amostras foram consideradas positivas se o valor de índice de reatividade foi  $\geq 1$ .

#### **4.7.1.5 Imunofluorescência indireta com antígeno *Leishmania major*-like (RIFI)**

Imunofluorescência indireta para pesquisa de anticorpos IgG anti-*Leishmania* foi realizada de acordo com o protocolo já estabelecido (Guimaraes *et al.*, 1974). Lâminas *multispot* foram preparadas com antígeno de promastigotas de *Leishmania major*-like (MHOM/BR/71/49). As amostras de soros foram diluídas a 1:40 em PBS 0,01M pH 7,2, aplicadas nas lâminas em duplicatas e incubadas por 30 minutos a 37°C em câmara úmida. Após três lavagens de 10 minutos em PBS 0,01M pH 7,2, sendo a primeira lavagem

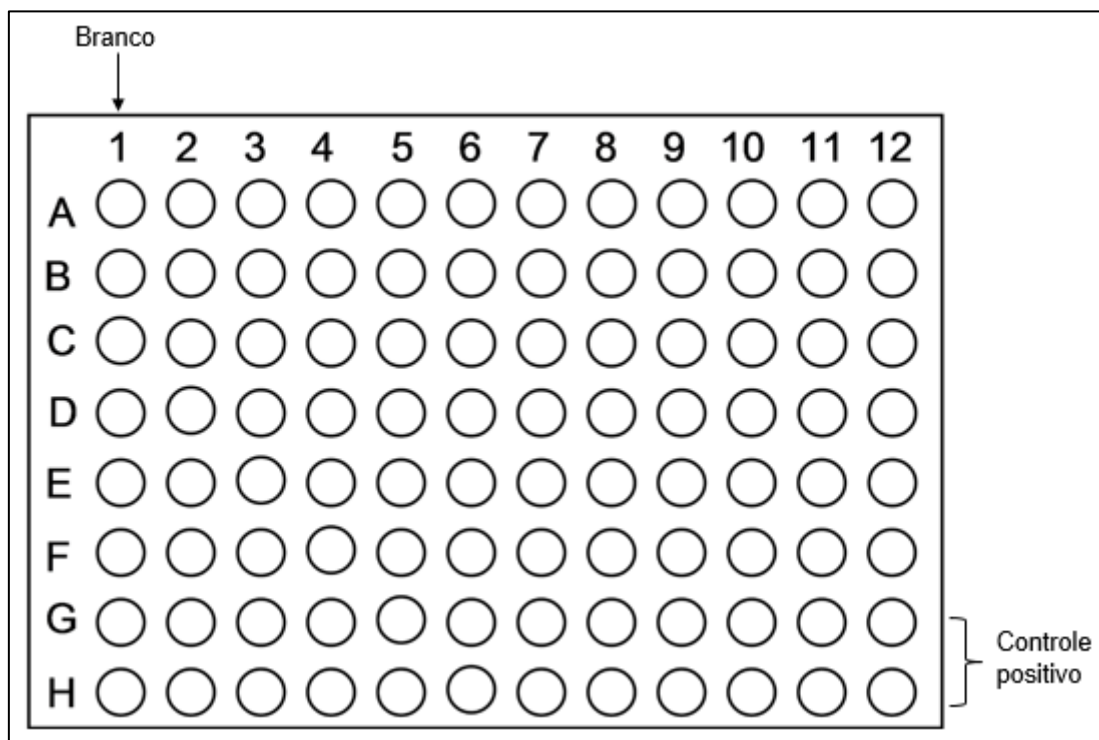
rápida e duas de 10 minutos cada, as lâminas foram secas e incubadas com 20µL em cada orifício com o conjugado anti-IgG humana (isotiocianato de fluoresceína, cadeia gama específica/ Biolab Mérieux, França), diluído a 1:150 em PBS 0,01M pH 7,2 com azul de Evans 4 mg%, nas mesmas condições. As lâminas foram novamente lavadas e montadas com glicerina tamponada pH 8,0. Os testes foram lidos em microscópio óptico Zeiss binocular (Carl Zeiss, Oberkochen, West Germany) em objetiva de água de 250 x. Em todos os testes foram adicionados um soro padrão positivo e um soro padrão negativo.

#### **4.7.1.6 Teste de aglutinação direta (DAT)**

Uma solução diluente foi preparada adicionando-se 10 mL de solução salina 0,9% e 78 µL de solução de β-mercapto-etanol. Acrescentou-se 5 µL de cada amostra de soro a 245 µL de solução diluente, gerando uma diluição de 1:50. As amostras foram distribuídas nos poços de fundo V, em diluições seriadas, partindo de 1:50 até 1:51.200. O antígeno de *Leishmania* liofilizado (Royal Tropical Institute - KIT) foi diluído em 5mL de solução salina 0,9%, seguindo recomendação do fabricante. Cada poço da placa recebeu 50 µL desta solução. Após 18 h de incubação, em câmara escura, foi realizada leitura dos resultados com auxílio de um aglutinoscópio. A presença de formação do complexo antígeno-anticorpo foi verificada pela ausência do botão de aglutinação no fundo do poço em V. A ausência desse complexo foi demonstrada pela formação do botão de aglutinação. A coluna 1 não recebeu amostras de soro, sendo considerada o branco da reação. Todos os poços dessa coluna deveriam apresentar o botão formado, indicando a



ausência da reação. As linhas G e H receberam as diluições seriadas de um controle positivo (Figura 2). Considerou-se o paciente com resultado positivo quando seu soro apresentava reação de aglutinação na diluição igual ou superior a 1:6.400.



FONTE: Adaptado de Adams ER, Jacquet D, Schoone G, Gidwani K, Boelaert M, et al. (2012) Leishmaniasis Direct Agglutination Test: Using Pictorials as Training Materials to Reduce Inter-Reader Variability and Improve Accuracy. PLOS Neglected Tropical Diseases 6(12): e1946.

**Figura 2-** Configuração da placa de DAT. Linhas representadas por letras e colunas representadas por números. Em destaque, localização do controle positivo e do “branco”.

## 4.7.2 Métodos moleculares

### 4.7.2.1 Extração de DNA

Amostras de sangue periférico colhidas em tubos de EDTA foram processadas utilizando protocolo específico para extração de DNA, com uso do Minikit QIAamp (QIAGEN, Chatsworth, CA, USA), conforme recomendações do fabricante. Após a extração, as amostras de DNA foram submetidas a análise de sua concentração e pureza, determinadas pela relação de leitura de absorvância (260/280 nm) no espectrofotômetro (NanoDrop Thermo Scientific 2000). Relação de aproximadamente 1,8 é considerada indicativa de pureza do DNA. Foi realizado PCR para beta-globina nas amostras negativas para verificação da presença de DNA humano.

### 4.7.2.2 Reação em cadeia da polimerase – alvo kDNA

Para a realização da PCR foi utilizado como alvo o minicírculo do kDNA, devido sua grande abundância no genoma da *Leishmania*, possuindo aproximadamente 10.000 cópias variando o tamanho entre 0,5kb e 2,9kb (Shapiro e Englund, 1995). Os *primers* escolhidos para realizar a amplificação dessa região foram os LINR4 e LIN19, que amplificam 720pb do minicírculo, aumentando a possibilidade de positividade mesmo em amostras com pouca quantidade de DNA parasitário (Aransay *et al.*, 2000).

O *mix* da reação era composto por: 30,2 µL de água DNase free, 4,0 µL de Tampão 10x PCR, 5,0 µL de MgCl<sub>2</sub> 50mM, 2,0 µL de cada primer de

iniciação LINR4 e LIN19 (10 pM/ $\mu$ L), 1,0  $\mu$ L de DNTP 10mM, e 0,8  $\mu$ L de *Taq* DNA polimerase recombinante (Invitrogen® - 5 U/ $\mu$ L), gerando um total de 45,0  $\mu$ L por amostra, em que foram adicionados 5,0  $\mu$ L do DNA extraído (50 ng/ $\mu$ L). As condições de reação no termociclador foram: 3 min a 94°C; trinta e três ciclos de 30s a 95°C, 30s a 58°C e 1 min a 72°C, para desnaturação inicial, anelamento e polimerização, respectivamente; seguido de 10min de extensão final a 72°C. As amostras amplificadas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% (1g de agarose + 100 mL de TAE 1x, aquecidos até dissolução completa da agarose) e para a corrida foram adicionados à cada 5  $\mu$ L de amostra, 1,0  $\mu$ L de tampão de corrida (Loading Dye 6X), como comparativo foi utilizado um *ladder* de 100pb. A eletroforese foi realizada durante 60 minutos, a 80V. Após a corrida, o gel foi submetido à coloração com brometo de etídeo. Cada reação incluiu um controle negativo e um controle positivo extraído de cultura de promastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi*.

#### 4.7.2.3 Reação da Cadeia da Polimerase – alvo ITS-1

Os primers utilizados na amplificação do ITS-1 foram: LITSR (5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3') e L5.8S (5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3'). O mix de reação de 50  $\mu$ L era composta por 2  $\mu$ L de DNA molde, 25  $\mu$ L de 2x GoTaq® Green Master Mix (Promega Corp., Madison, WI) e 5  $\mu$ L (10pmol/ $\mu$ L) de cada primer. GoTaq® Green Master Mix é composta por 2x Green GoTaq reaction Buffer (pH 8.5), 400  $\mu$ M dATP, 400  $\mu$ M dGTP, 400  $\mu$ M dCTP, 400  $\mu$ M dTTP e 4 mM MgCl<sub>2</sub>. A amplificação foi realizada de acordo com as seguintes condições: desnaturação inicial 94° C por 3 min e 35 ciclos: 94° C por 40 s; 53°

C por 45 s; 72° C por 1 min e uma extensão final a 72° C por 6 min. O ITS-1 produz um fragmento de 300 – 350 pb, dependendo da espécie de *Leishmania* spp. (SCHÖNIAN et al., 2003). As amplificações ocorreram no termocilador LifePro thermal cyler (Bioer Technology). Cada reação incluiu um controle negativo e um controle positivo extraído de cultura de promastigotas de *Leishmania infantum*.

#### **4.8 Análise estatística**

Um banco de dados foi gerado no Microsoft Excel 2013®. A análise e interpretação dos resultados foi feita a partir do Microsoft Excel 2013® e Graph Prism 5®. Para cada teste diagnóstico, foram separados os grupos com resultado reagente e não-reagente e comparados segundo as seguintes características: idade, gênero, presença de epidemiologia para LV, tempo de diagnóstico da infecção pelo HIV, contagem de linfócitos T CD4+, uso regular de TARV, uso de inibidor de protease no esquema antirretroviral, histórico de infecção oportunista prévia, diagnóstico de tuberculose prévio, presença de comorbidades, presença de sintomas característicos de LV, presença de intercorrência clínica em tratamento no momento da inclusão, presença de alterações laboratoriais (anemia, leucopenia ou plaquetopenia).

O valor de “p” foi calculado utilizando diferentes testes estatísticos, a depender da variável analisada: Teste Qui-quadrado e Teste exato de Fisher para variáveis categóricas; Teste de Mann Whitney para variáveis contínuas com distribuição não-paramétrica; Teste *t*, para variáveis contínuas com distribuição paramétrica. Para variáveis contínuas com distribuição normal, o

valor da média foi usado para efeito de comparação; quando as variáveis apresentavam distribuição não-paramétrica, os valores de mediana foram utilizados. Foram considerados estatisticamente significativos os dados para os quais os valores de  $p < 0,05$ . Foi calculada a concordância entre as provas através do índice *Kappa*, com as seguintes interpretações: valores  $<0$  - nenhuma; valores entre 0,00-0,19 - ruim; valores entre 0,20 - 0,39 - razoável; valores entre 0,40 - 0,59 - moderada; valores entre 0,60 - 0,79 - ótima; valor de 1,0 - perfeita.

#### **4.9 Considerações sobre questões éticas da pesquisa**

Em todas as circunstâncias foram observadas as recomendações de respeito à privacidade e à confidencialidade previstas pela Resolução nº 196, de 10 de outubro de 1996, Conselho Nacional de Saúde para a Pesquisa Científica em Seres Humanos. O projeto foi submetido e aprovado nos Comitês de Ética e Pesquisa do Instituto de Infectologia Emilio Ribas (CAAE: 12287213.2.0000.0061) e Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAAE: 12287213.2.3001.0065). Foram formalizados os termos de confidencialidade e termo de consentimento livre e esclarecido entre os autores do projeto e os sujeitos da pesquisa.

## **5. Resultados**

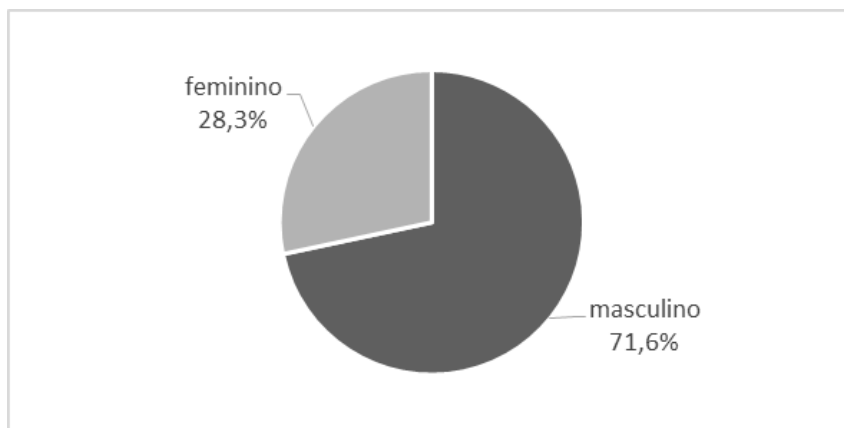
---

## 5.1 Resultados gerais

Inicialmente foram incluídos 245 pacientes, sendo que cinco indivíduos foram excluídos da análise por inadequação no armazenamento de amostras. Em dois pacientes incluídos foi realizado aspirado de medula para pesquisa direta de *Leishmania* spp. Em nenhum paciente foi constatada presença de *Leishmania* spp. através da pesquisa direta.

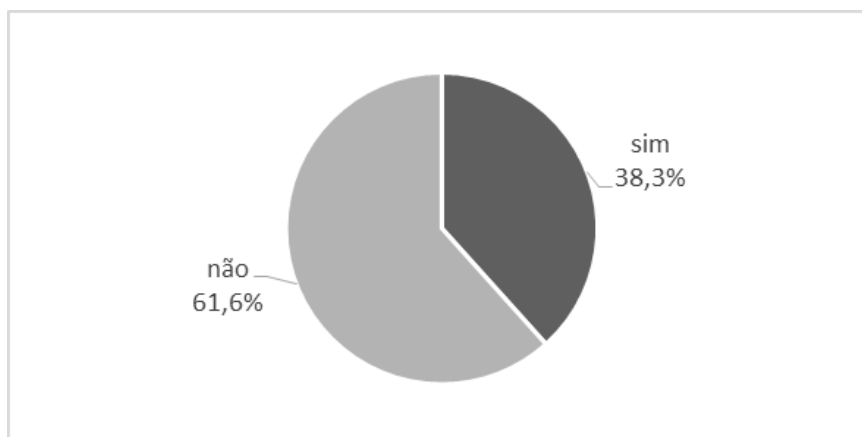
Dos 240 indivíduos, 172 (71,6%) eram do sexo masculino (Gráfico 1). A média de idade dos pacientes foi de 46 anos, variando de 24 a 80 anos, com mediana de 45,5 anos.

**Gráfico 1** - Distribuição dos 240 pacientes vivendo com HIV/aids, atendidos no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril/2015 a março/2016) segundo o gênero



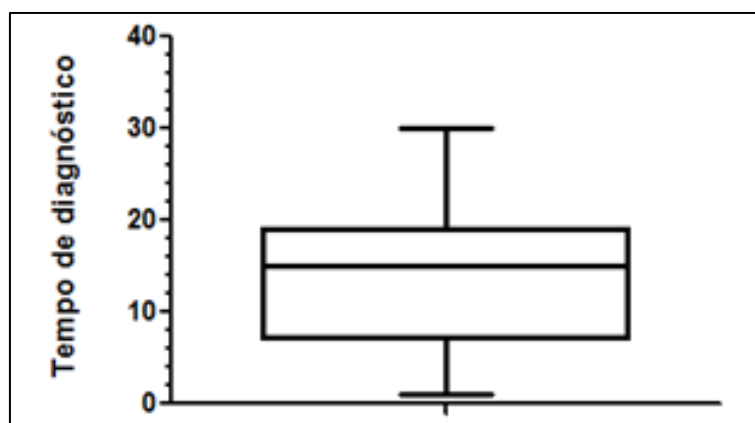
Com relação à epidemiologia para LV (definida como ter nascido ou morado por mais de um ano em área de transmissão autóctone), 92 pacientes (38,3%) tinham epidemiologia documentada, enquanto em 148 (61,6%) não tiveram os critérios necessários e foram considerados sem epidemiologia documentada para LV (Gráfico 2).

**Gráfico 2 -** Distribuição de 240 pacientes vivendo com HIV/aids atendidos no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril/2015 a março/2016) segundo presença de epidemiologia para leishmaniose visceral



A mediana de tempo de diagnóstico da infecção pelo HIV foi de 15 anos, variando de um a 30 anos (Gráfico 3).

**Gráfico 3-** Boxplot da distribuição do tempo de diagnóstico (anos) da infecção pelo HIV dos 240 pacientes vivendo com HIV/aids atendidos no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril/2015 a março/2016)



Os dados referentes aos estados da federação de nascimento, mostram predomínio de São Paulo (57,5%), seguido da Bahia (9,6%), Pernambuco (7,5%) e Minas Gerais (6,3%). Quatro pacientes não eram nascidos no Brasil (Tabela 1).



**Tabela 1 –** Distribuição de 240 pacientes vivendo com HIV/aids acompanhados no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril/2015 a março/2016) incluídos, segundo estado de nascimento

<b>ESTADO</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
AL	3	1,3
BA	23	9,6
CE	4	1,7
DF	1	0,4
GO	2	0,8
MA	4	1,7
MG	15	6,3
MS	1	0,4
PB	7	2,9
PE	18	7,5
PI	1	0,4
PR	5	2,1
RJ	7	2,9
RN	1	0,4
RS	4	1,7
SC	1	0,4
SP	138	57,5
TO	1	0,4
OUTROS PAÍSES	4	1,7

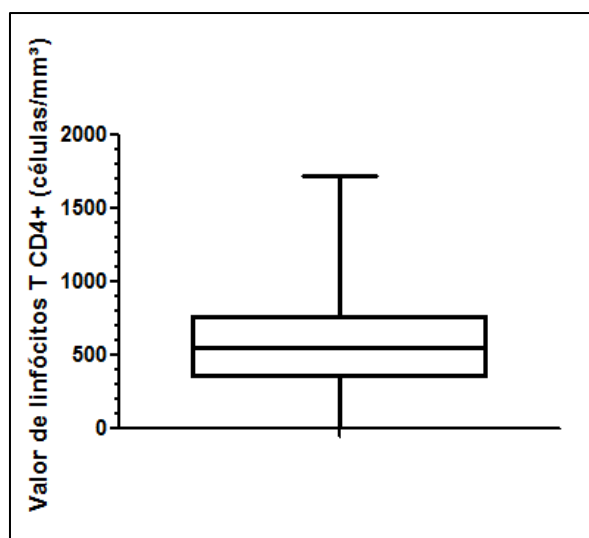
Uso regular de terapia antirretroviral foi referido por 211 pacientes (87,9%). Uso de algum medicamento da classe dos inibidores de protease foi constatado em 119 pacientes (49,6%) (Tabela 2).

**Tabela 2-** Distribuição de 240 pacientes vivendo com HIV/aids acompanhados no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril/2015 a março/2016) quanto ao uso regular de TARV e uso de esquema antiretroviral contendo inibidor de protease

	Uso regular de TARV		Uso de Inibidor de Protease	
	N	%	N	%
<b>Sim</b>	211	87,9	119	49,6
<b>Não</b>	29	12,1	121	50,4

O menor valor constatado de contagem de linfócitos T CD4+ foi 2 células/mm<sup>3</sup> e o maior foi 1724 células/mm<sup>3</sup>, com mediana de 547,5 células/mm<sup>3</sup> (Gráfico 4).

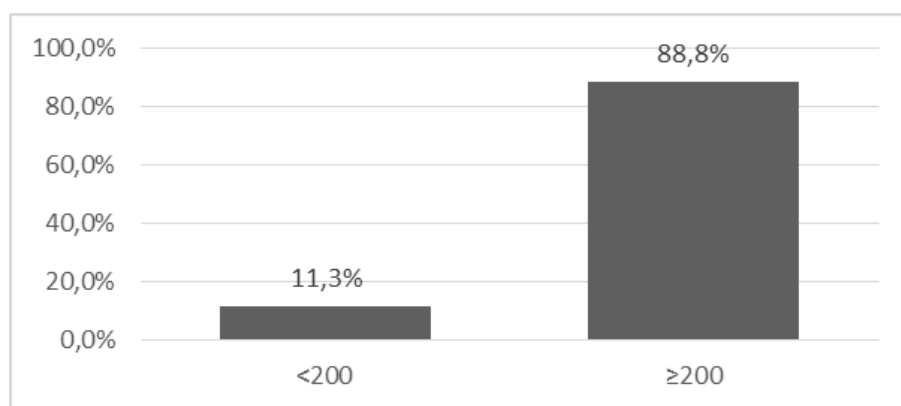
**Gráfico 4-** *Boxplot* demonstrando a distribuição do valor da contagem de linfócitos T CD4+ dos 240 pacientes vivendo com HIV/aids acompanhados no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril/2015 a março/2016)



Valores de contagem de linfócitos T CD4+ menores que 200 células/mm<sup>3</sup> foram observados em 27 pacientes (11,3%), enquanto 213

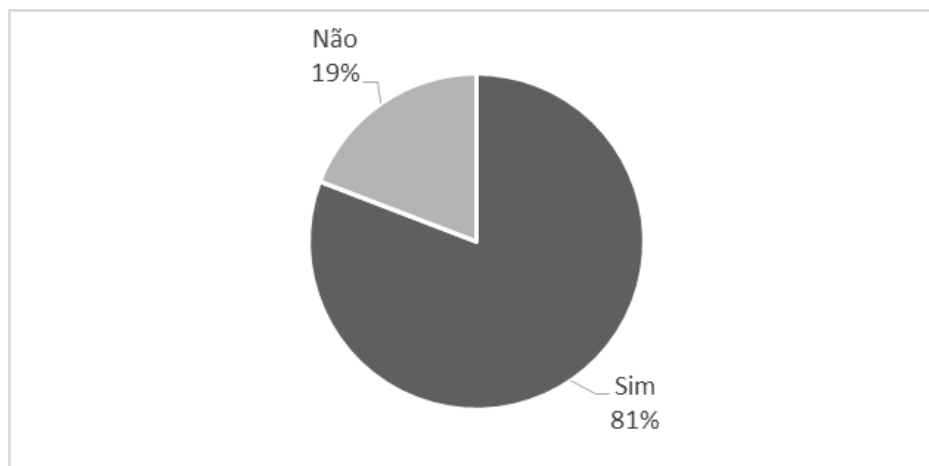
pacientes (88,8%) apresentavam contagem de linfócitos T CD4+ maior ou igual a 200 células/mm<sup>3</sup> (Gráfico 5).

**Gráfico 5-** Distribuição de 240 pacientes vivendo com HIV/aids atendidos no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril/2015 a março/2016) categorizados de acordo com a contagem de linfócitos T CD4+ (em células/mm<sup>3</sup>)



Dos 240 pacientes, 195 (81,3%) apresentavam carga viral indetectável ( $\leq 40$  cópias/mL) (Gráfico 6). A tabela 3 mostra os níveis de carga viral dos pacientes incluídos, para as seguintes categorias: entre zero e 40 cópias/mL (limite de detecção do teste utilizado); entre 41 e 10.000 cópias/mL; entre 10.001 e 100.000 cópias/mL; maior que 100.000 cópias/mL.

**Gráfico 6-** Distribuição de 240 pacientes vivendo com HIV/aids atendidos no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril/2015 a março/2016) quanto à ausência de detecção de cópias de HIV-1 em sangue periférico (células/mm<sup>3</sup>)

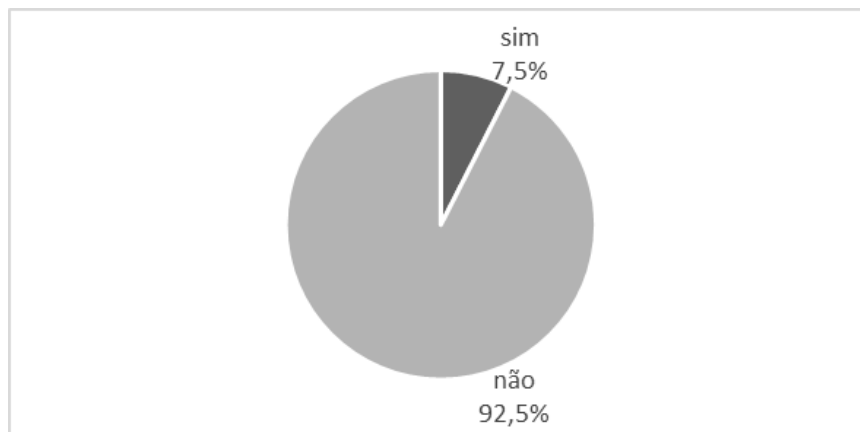


**Tabela 3-** Distribuição de 240 pacientes vivendo com HIV/aids atendidos no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril/2015 a março/2016) quanto aos valores de carga viral

Carga viral (cópias/mL)	N	%
0-40	195	81,3
41-10.000	24	10,0
10.001-100.000	19	7,9
>1.000.000	2	0,8

Com relação aos sinais e sintomas apresentados, 18 (7,5%) pacientes apresentavam pelo menos um sintoma compatível com LV (febre, esplenomegalia ou perda de peso). Destes 18 pacientes, esplenomegalia estava presente em quatro, febre em 13 pacientes e perda de peso em 16 pacientes. A tríade febre, esplenomegalia e perda de peso estava presente em 3 pacientes. Duzentos e vinte e dois pacientes (92,5%) foram considerados assintomáticos para LV (Gráfico 7).

**Gráfico 7-** Distribuição de 240 pacientes vivendo com HIV/aids atendidos no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril/2015 a março/2016) incluídos em relação à presença ou não de sintomas considerados compatíveis com LV



Referente às alterações laboratoriais, 44 (18,3%) pacientes apresentavam anemia, 29 (12,1%) pacientes apresentavam leucopenia e 12 (5%) apresentavam plaquetopenia. Quatro (1,7%) pacientes apresentavam pancitopenia (Tabela 4). Dos pacientes com sintomas característicos de LV, 17 apresentavam anemia (94,4%), 11 (61,1%) apresentavam leucopenia e 2 (11,1%) pacientes apresentavam plaquetopenia; um paciente apresentava pancitopenia (Tabela 5).

**Tabela 4-** Distribuição de 240 pacientes vivendo com HIV/aids acompanhados no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril/2015 a março/2016) incluídos em relação à presença das alterações laboratoriais: anemia, leucopenia, plaquetopenia e pancitopenia

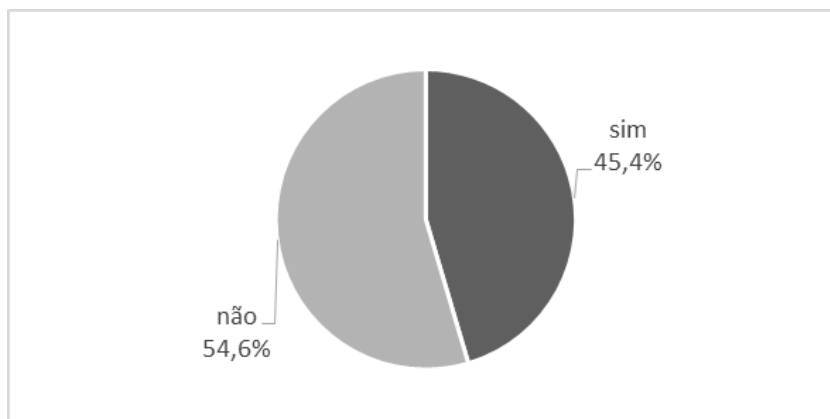
	Anemia		Leucopenia		Plaquetopenia		Pancitopenia				
	N	%	N	%	N	%	N	%			
Sim	44	18,3	Sim	29	12,1	Sim	12	5	Sim	4	1,7
Não	196	81,7	Não	211	87,9	Não	228	95	Não	236	98,3

**Tabela 5-** Distribuição dos pacientes com sintomas característicos de LV (18 pacientes no total) em relação à presença das alterações laboratoriais: anemia, leucopenia, plaquetopenia

	Anemia		Leucopenia		Plaquetopenia			
	N	%	N	%	N	%		
<b>Sim</b>	17	94,4	<b>Sim</b>	11	61,1	<b>Sim</b>	2	11,1
<b>Não</b>	1	5,6	<b>Não</b>	7	38,9	<b>Não</b>	16	88,9

Em relação à presença de comorbidades crônicas, 109 (45,4%) pacientes apresentavam pelo menos uma comorbidade descrita (Gráfico 8). As mais prevalentes foram: dislipidemia (14,2%), hipertensão arterial sistêmica (9,6%), hepatite C (6,7%), diabetes mellitus (5,8%), tabagismo (5,4%), depressão (4,6%), hipotireoidismo (3,7%), hepatite B (3,3%), obesidade (2,5%) (Tabela 6). Comorbidades citadas em menos de 2% dos casos incluíram: dependência química de drogas ilícitas, etilismo, transtorno bipolar, lipodistrofia, litíase renal, osteoporose, infecção pelo HTLV, prolapso mitral, anemia falciforme, arritmia, artrite reumatoide, hérnia de disco, doença de Chagas, esquizofrenia, doença pulmonar obstrutiva crônica, insuficiência cardíaca, gota, epilepsia, esteatose hepática, fibrose pulmonar, hiperplasia prostática benigna.

**Gráfico 8-** Distribuição de 240 pacientes vivendo com HIV/aids atendidos no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril/2015 a março/2016) incluídos em relação à presença de comorbidades



**Tabela 6-** Distribuição das comorbidades mais prevalentes citadas pelos pacientes vivendo com HIV/aids atendidos no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril/2015 a março/2016)

Comorbidade	N	%
Dislipidemia	34	14,2
Hipertensão arterial sistêmica	23	9,6
Hepatite C	16	6,7
Diabetes mellitus	14	5,8
Tabagismo	13	5,4
Depressão	11	4,6
Hipotireoidismo	9	3,8
Hepatite B	8	3,3
Obesidade	6	2,5

Um total de 28 (11,7%) pacientes estavam em tratamento atual para alguma intercorrência clínica (não consideradas comorbidades crônicas). Desses, nove pacientes tinham diagnóstico de tuberculose, sendo cinco com a forma pulmonar da doença, três com forma disseminada e um paciente com a

forma ganglionar. Também referente aos 28 pacientes em tratamento para alguma doença, cinco tinham o diagnóstico de doença invasiva por CMV, três de neurotoxoplasmose, dois de sarcoma da Kaposi, dois de linfoma de Hodgkin, dois de neurocriptococose, dois de neurosífilis. Abscesso muscular, doença desmielinizante, linfoma primário de sistema nervoso central, aspergilose pulmonar, cirrose hepática e pneumocistose foram citadas uma vez cada. Quatro pacientes tinham mais de uma doença atual em tratamento. Ainda em relação aos 28 pacientes que estavam em tratamento para outras doenças, 17 deles tinham sintomas compatíveis com LV, pois apresentavam pelo menos um dos critérios acima descritos: febre, esplenomegalia e perda de peso.

Referente ao registro de infecções oportunistas prévias, 53 pacientes (22,1%) já haviam apresentado alguma infecção oportunista e 14 pacientes (5,8%) tinham relato de mais de uma infecção oportunista (Tabela 7). As infecções oportunistas citadas foram: pneumocistose, relatada em 19 (7,9%) pacientes; micobacteriose disseminada, relatada em 12 (5%) pacientes; neurotoxoplasmose, relatada em 11 (4,6%) pacientes; criptococose extrapulmonar, relatada em 10 (4,2%) pacientes; doença pelo CMV, relatada em oito (3,3%) pacientes; candidíase esofágica, relatada em seis (2,5%) pacientes; sarcoma de Kaposi, relatado em cinco (2,1%) pacientes. Além disso, 20,5% dos pacientes tinham histórico de tratamento para sífilis e 13,7% para tuberculose (forma não disseminada), doenças não classificadas como definidoras de AIDS.



**Tabela 7-** Distribuição de 240 pacientes vivendo com HIV/aids acompanhados no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril/2015 a março/2016) em relação à presença de infecções oportunistas prévias e proporção de pacientes que tiveram mais de uma infecção oportunista relatada, em relação ao total de pacientes

<b>Categoria</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
Pelo menos uma IO prévia	53	22,1
Nenhuma IO prévia	187	77,9
Mais de uma IO prévia	14	5,8

Com referência aos métodos laboratoriais, todos os 240 pacientes foram submetidos aos seguintes métodos: ELISA *L. major*-like, ELISA *Leptomonas*, ELISA rK39, ELISA rK28, RIFI, DAT, PCR kDNA, PCR ITS-1.

Para ELISA *L. major*-like, 60 amostras (25%) foram reagentes; para ELISA *Leptomonas*, nove amostras (3,75%) foram reagentes; para ELISA rK39, três amostras (1,3%) foram reagentes; para ELISA rK28, seis amostras (2,5%) foram reagentes; para RIFI, 11 amostras foram reagentes (4,6%); para DAT, nenhuma amostra (0,0%) foi reagente; para PCR kDNA, quatro amostras (1,7%) foram positivas; para PCR ITS-1, 10 amostras (4,8%) foram positivas. As frequências obtidas com cada teste e seus respectivos intervalos de confiança estão apresentados na Tabela 8. Presença de pelo menos um teste diagnóstico positivo foi observada em 83 pacientes (34,6%).

**Tabela 8-** Distribuição dos pacientes vivendo com HIV/aids acompanhados no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril/2015 a março/2016) em relação à positividade dos métodos diagnósticos de leishmaniose

	<b>Total n (%)</b>	<b>95%IC</b>
<b>ELISA <i>L. major</i>-like</b>	60 (25,0)	19,9 – 30,8
<b>ELISA <i>Leptomonas</i></b>	9 (3,8)	2,0 – 7,0
<b>ELISA rK39</b>	3 (1,3)	0,4 – 3,6
<b>ELISA rK28</b>	6 (2,5)	1,2 – 5,3
<b>IFAT</b>	11 (4,6)	2,6 – 8,0
<b>DAT</b>	0 (0,0)	-
<b>PCR kDNA</b>	4 (1,7)	0,6 – 4,2
<b>PCR ITS-1</b>	10 (4,2)	2,3 – 7,5
<b>Pelo menos um teste positivo</b>	83 (34,6)	28,6 – 40,8

N = Número; IC= Intervalo de confiança

## 5.2 ELISA *L. major*-like

Os dados referentes aos resultados de ELISA *L. major*-like foram separados em dois grupos (ELISA *L. major*-like reagente e ELISA *L. major*-like não-reagente) e estão apresentados na tabela 9. Não houve diferença estatística em relação às seguintes variáveis analisadas: faixa etária, proporção por gênero nos dois grupos, epidemiologia para LV, tempo de diagnóstico da infecção pelo HIV, uso de inibidor de protease, doenças oportunistas prévias, diagnóstico prévio ou atual de tuberculose (Tabela 9). Em relação às características clínicas apresentadas pelos pacientes no momento da inclusão, a presença de comorbidades, presença de sintomas compatíveis com LV, presença de alguma intercorrência clínica no momento da inclusão e presença de anemia, leucopenia ou plaquetopenia também não mostraram associações com a positividade deste teste sorológico.

A variável “contagem de linfócitos T CD4+” foi categorizada em valores abaixo de 200 células/mm<sup>3</sup> e valores maiores ou iguais a 200 células/mm<sup>3</sup>. Para essa comparação, observou-se menor proporção de pacientes com testes sorológicos reagentes entre os que tinham contagem de linfócitos T CD4+ maior ou igual a 200 células/mm<sup>3</sup>, do que naqueles que tinham contagem de linfócitos T CD4 + menor que 200 células/mm<sup>3</sup> (p = 0,013) (Gráfico 9).

O uso regular ou irregular de TARV também foi avaliado. Observou-se maior proporção de pacientes com esses testes sorológicos positivos entre os que não usavam TARV de forma regular, do que naqueles que usavam TARV de forma regular (p = 0,009) (Gráfico 10). Não houve associação entre o uso de inibidor de protease no esquema antirretroviral e a positividade deste teste sorológico.

**Tabela 9-** Características associadas à reatividade do teste ELISA *L. major*-like em 240 pessoas vivendo com HIV/aids atendidos no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril de 2015 a março de 2016)

	ELISA <i>L. major</i> -like		p	OR	IC (95%)
	Reagente	Não reagente			
<b>Idade, média</b>	47,0	45,9	0,455*		
<b>Sexo, n</b>					
Masculino	42	130	0,741**	0,90	0,47 - 1,70
Feminino	18	50			
<b>Epidemiologia para LV, n</b>					
Sim	20	72	0,358**	0,75	0,41 - 1,39
Não	40	108			
<b>Tempo de diagnóstico da infecção pelo HIV (anos), mediana</b>	12,0	15,0	0,153***		
<b>Contagem de linfócitos T CD4+ (células/mm<sup>3</sup>), média</b>	525,3	582,8	0,222*		

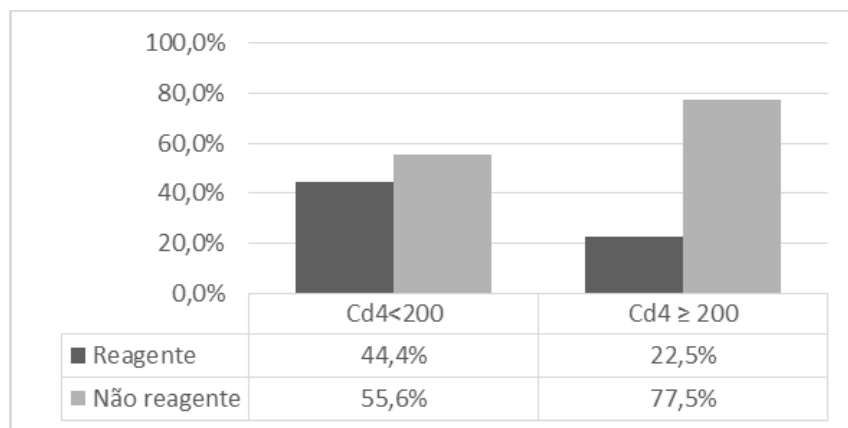
Continua

**Tabela 9-** Características associadas à reatividade do teste ELISA *L. major*-like em 240 pessoas vivendo com HIV/aids atendidos no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril de 2015 a março de 2016) (Continuação)

	ELISA <i>L. major</i> -like		p	OR	IC (95%)
	Reagente	Não reagente			
<b>Contagem de linfócitos T CD4+ (células/mm<sup>3</sup>), n</b>					
<200	12	15	0,013**	2,75	1,21 - 6,27
≥200	48	165			
<b>Uso regular de TARV, n</b>					
Sim	47	164	0,009**	0,35	0,31 - 0,80
Não	13	16			
<b>Uso de inibidor de protease, n</b>					
Sim	32	87	0,502**	1,22	0,68 - 2,19
Não	28	93			
<b>Presença de infecção oportunista prévia, n</b>					
Sim	12	41	0,653**	0,85	0,41 - 1,75
Não	48	139			
<b>Diagnóstico de tuberculose atual, n</b>					
Sim	3	6	0,695****	1,53	0,37 - 6,30
Não	57	174			
<b>Diagnóstico de tuberculose prévio, n</b>					
Sim	12	29	0,488**	1,3	0,71 - 2,07
Não	48	151			
<b>Presença de comorbidades, n</b>					
Sim	26	83	0,708**	0,89	0,50 - 1,61
Não	34	97			
<b>Sintomas compatíveis com LV no momento da inclusão, n</b>					
Sim	5	13	0,780****	1,17	0,40 - 3,42
Não	55	167			
<b>Intercorrência clínica em tratamento no momento da inclusão, n</b>					
Sim	10	18	0,164**	1,8	0,78 - 4,15
Não	50	162			
<b>Presença de anemia e/ou leucopenia e/ou plaquetopenia, n</b>					
Sim	18	40	0,223**	1,5	0,78 - 2,89
Não	42	140			

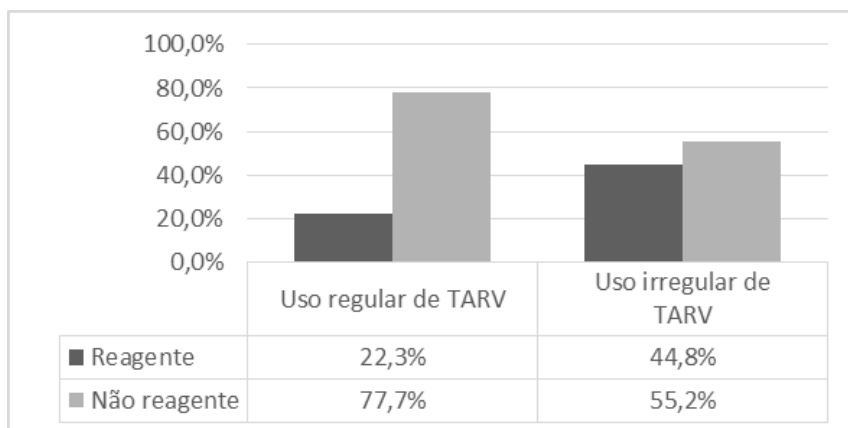
OR = Odds Ratio; IC = Intervalo de confiança; n=número; \* Teste *t* de Student; \*\* Chi-quadrado; \*\*\*Mann Whitney; \*\*\*\*Teste exato de Fisher

**Gráfico 9-** Distribuição de 240 pacientes vivendo com HIV/aids atendidos no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril/2015 a março/2016), categorizados pela reatividade de ELISA *L. major*-like e valor de contagem de linfócitos T CD4+ (células/mm<sup>3</sup>)



Teste Qui-quadrado.  $p=0,013$

**Gráfico 10-** Distribuição de 240 pacientes vivendo com HIV/aids atendidos no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril/2015 a março/2016), categorizados pela reatividade de ELISA *L. major*-like e uso de terapia antirretroviral



Teste Qui-quadrado.  $p=0,009$

### 5.3 ELISA *Leptomonas*

Os dados referentes aos resultados de ELISA *Leptomonas* foram separados em dois grupos (ELISA *Leptomonas* reagente e ELISA *Leptomonas*

não-reagente) e estão apresentados na Tabela 10. Não houve diferença estatística em relação às seguintes variáveis analisadas: faixa etária, proporção por gênero nos dois grupos, epidemiologia para LV, tempo de diagnóstico da infecção pelo HIV, uso regular de TARV, uso de inibidor de protease, doenças oportunistas prévias, diagnóstico prévio ou atual de tuberculose. Em relação às características clínicas apresentadas pelos pacientes no momento da inclusão, a presença de comorbidades, presença de sintomas compatíveis com LV, presença de alguma intercorrência clínica no momento da inclusão e presença de anemia, leucopenia ou plaquetopenia também não mostraram associações com a positividade deste teste sorológico.

Comparando-se os valores contínuos de contagem de linfócitos T CD4+ (em células/mm<sup>3</sup>) nos dois grupos, observou-se mediana mais baixa naqueles pacientes com esse teste sorológico reagente (347,0), quando comparados àqueles com ELISA *Leptomonas* não reagente, cuja mediana foi de 564,0, com significância estatística ( $p = 0,033$ ) (Gráfico 11). A variável “contagem de linfócitos T CD4+” foi categorizada em valores abaixo de 200 células/mm<sup>3</sup> e valores maiores ou iguais a 200 células/mm<sup>3</sup>. Também em relação a esta comparação, observou-se menor proporção de pacientes com testes sorológicos reagentes entre os que tinham contagem de linfócitos T CD4+ maior ou igual a 200 células/mm<sup>3</sup>, do que naqueles que tinham contagem de linfócitos T CD4 + menor que 200 células/mm<sup>3</sup> ( $p = 0,011$ ) (Gráfico 12).

**Tabela 10-** Características associadas à reatividade do teste ELISA *Leptomonas* em 240 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril de 2015 a março de 2016)

	ELISA <i>Leptomonas</i>		p	OR	IC (95%)
	Reagente	Não reagente			
<b>Idade, média</b>	50,67	46,01	0,168*		
<b>Sexo, n</b>					
Masculino	7	165	1,000**	1,40	0,28 - 6,92
Feminino	2	66			
<b>Epidemiologia para LV, n</b>					
Sim	5	87	0,310**	2,07	0,54 - 7,95
Não	4	144			
<b>Tempo de diagnóstico da infecção pelo HIV (anos), mediana</b>	12	15	0,862** *		
<b>Contagem de linfócitos T CD4+ (células/mm<sup>3</sup>), mediana</b>	347	564	0,033** *		
<b>Contagem de linfócitos T CD4+ (células/mm<sup>3</sup>), n</b>					
<200	4	23	0,011**	7,24	1,81 - 28,87
≥200	5	208			
<b>Uso regular de TARV, n</b>					
Sim	6	205	0,081**	0,25	0,06 - 1,08
Não	3	26			
<b>Uso de inibidor de protease, n</b>					
Sim	3	116	0,500**	0,50	0,12 - 2,03
Não	6	115			
<b>Presença de infecção oportunista prévia, n</b>					
Sim	3	38	0,185**	0,43	0,05 - 3,52
Não	6	193			
<b>Diagnóstico de tuberculose atual, n</b>					
Sim	1	8	0,295**	3,48	0,39 - 31,31
Não	8	223			
<b>Diagnóstico de tuberculose prévio, n</b>					
Sim	3	38	0,185**	2,54	0,61 - 10,60
Não	6	193			

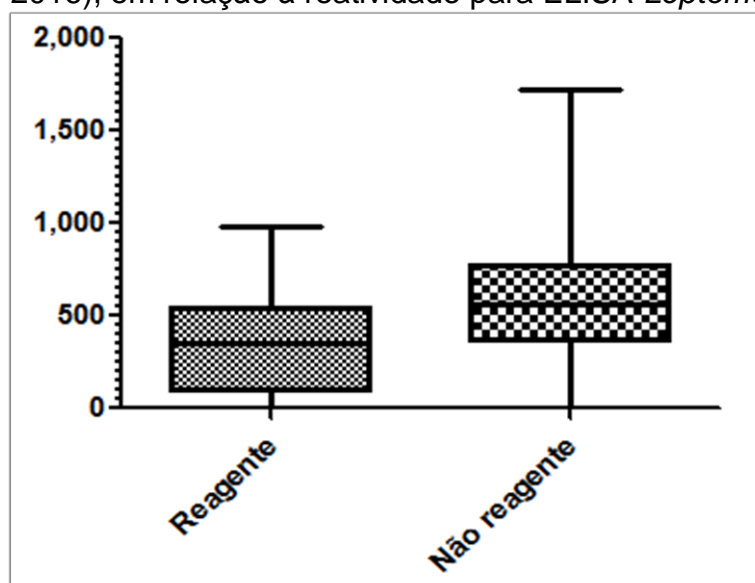
Continua

**Tabela 10-** Características associadas à reatividade do teste ELISA *Leptomonas* em 240 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril de 2015 a março de 2016) (Continuação)

	ELISA <i>Leptomonas</i>		p	OR	IC (95%)
	Reagente	Não reagente			
<b>Presença de comorbidades, n</b>					
Sim	2	107	0,188**		
Não	7	124			
<b>Sintomas compatíveis com LV no momento da inclusão, n</b>					
Sim	1	17	0,510**	1,57	0,19 - 13,34
Não	8	214			
<b>Intercorrência clínica em tratamento no momento da inclusão, n</b>					
Sim	3	25	0,074**	4,12	0,97 - 17,51
Não	6	206			
<b>Presença de anemia e/ou leucopenia e/ou plaquetopenia, n</b>					
Sim	4	54	0,225**	2,62	0,68 - 10,11
Não	5	177			

OR = Odds Ratio; IC = Intervalo de confiança; n = número \* Teste t de Student; \*\* Teste exato de Fisher; \*\*\*Mann Whitney

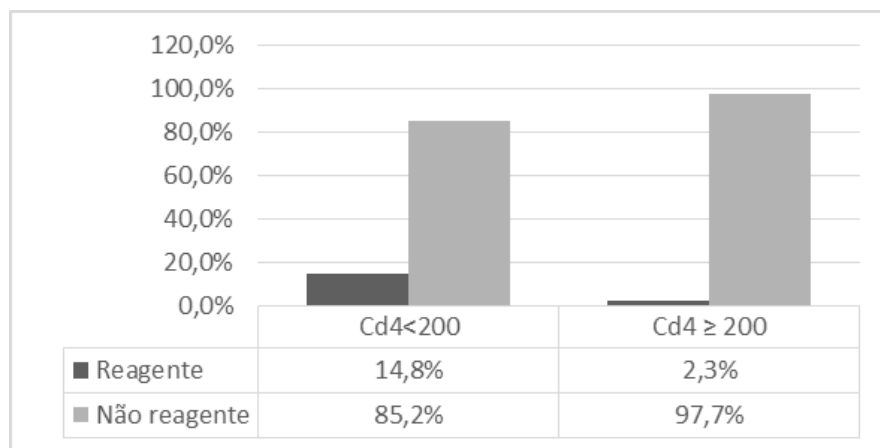
**Gráfico 11-** *Boxplot* da distribuição dos valores de contagem de linfócitos T CD4+ dos 240 pacientes vivendo com HIV/aids acompanhados no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril/2015 a março de 2016), em relação à reatividade para ELISA *Leptomonas*



Teste de Mann Whitney aplicado.  $p = 0,033$ .



**Gráfico 12** - Distribuição de 240 pacientes vivendo com HIV/aids acompanhados no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril/2015 a março de 2016), categorizados pela reatividade de ELISA *Leptomonas* e valor de contagem de linfócitos T CD4+ (células/mm<sup>3</sup>).



Teste exato de Fisher aplicado.  $p=0,011$ .

#### 5.4 ELISA rK39

Os dados referentes aos resultados de ELISA rK39 foram separados em dois grupos (ELISA rK39 reagente e ELISA rK39 não-reagente) e analisados segundo às variáveis clínicas, laboratoriais e epidemiológicas (Tabela 11). Não houve diferença estatística em relação qualquer uma das variáveis analisadas: faixa etária, proporção por gênero nos dois grupos, epidemiologia para LV, tempo de diagnóstico da infecção pelo HIV, contagem de linfócitos T CD4+, uso regular de TARV, uso de inibidor de protease, doenças oportunistas prévias, diagnóstico prévio ou atual de tuberculose. Em relação às características clínicas apresentadas pelos pacientes no momento da inclusão, a presença de comorbidades, presença de sintomas compatíveis com LV, presença de alguma intercorrência clínica no momento da inclusão e

presença de anemia, leucopenia ou plaquetopenia também não mostraram associações com a positividade deste teste sorológico.

**Tabela 11-** Características associadas à reatividade do teste ELISA rK39 em 240 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril de 2015 a março de 2016).

	ELISA rK39		p	OR	IC (95%)
	Reagente	Não reagente			
<b>Idade, mediana</b>	51,00	46,00	0,189*	–	–
<b>Sexo, n</b>					
Masculino	2	171	1,000**	0,77	0,07 - 8,66
Feminino	1	66			
<b>Epidemiologia para LV, n</b>					
Sim	1	91	1,000**	0,80	0,07 - 8,98
Não	2	146			
<b>Tempo de diagnóstico da infecção pelo HIV (anos), mediana</b>	18,00	14,00	0,169*	–	–
<b>Contagem de linfócitos T CD4+ (células/mm<sup>3</sup>), mediana</b>	426,0	539,5	0,779**		
<b>Contagem de linfócitos T CD4+ (células/mm<sup>3</sup>), n</b>					
<200	0	27	1,000**	–	–
≥200	3	210			
<b>Uso regular de TARV, n</b>					
Sim	3	208	1,000**	–	–
Não	0	29			
<b>Uso de inibidor de protease, n</b>					
Sim	2	117	0,620**	2,05	0,18 - 22,94
Não	1	120			
<b>Presença de infecção oportunista prévia, n</b>					
Sim	1	52	0,529**	1,78	0,16 - 20,02
Não	2	185			
<b>Diagnóstico de tuberculose atual, n</b>					
Sim	0	9	1,000**	–	–
Não	3	228			
<b>Diagnóstico de tuberculose prévio, n</b>					
Sim	0	41	1,000**	–	–
Não	3	196			

Continua

**Tabela 11-** Características associadas à reatividade do teste ELISA rK39 em 240 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril de 2015 a março de 2016). (Continuação)

	ELISA rK39		p	OR	IC (95%)
	Reagente	Não reagente			
<b>Presença de comorbidades, n</b>					
Sim	1	129	0,595**	0,42	0,04 - 4,68
Não	2	108			
<b>Sintomas compatíveis com LV no momento da inclusão, n</b>					
Sim	0	18	1,000**	–	–
Não	3	219			
<b>Intercorrência clínica em tratamento no momento da inclusão, n</b>					
Sim	0	28	1,000**	–	–
Não	3	209			
<b>Presença de anemia e/ou leucopenia e/ou plaquetopenia, n</b>					
Sim	0	58	1,000**	–	–
Não	3	179			

OR = Odds Ratio; IC = Intervalo de confiança; n= número; \* Mann Whitney; \*\* Teste exato de Fisher

## 5.5 ELISA rK28

Os dados referentes aos resultados de ELISA rK28 foram separados em dois grupos (ELISA rK28 reagente e ELISA rK28 não-reagente) e analisados segundo às variáveis clínicas, laboratoriais e epidemiológicas (Tabela 12). Não houve diferença estatística em relação qualquer uma das variáveis analisadas: faixa etária, proporção por gênero nos dois grupos, epidemiologia para LV, tempo de diagnóstico da infecção pelo HIV, contagem de linfócitos T CD4+, uso regular de TARV, uso de inibidor de protease, doenças oportunistas prévias, diagnóstico prévio ou atual de tuberculose. Em relação às características clínicas apresentadas pelos pacientes no momento da inclusão, a presença de comorbidades, presença de sintomas compatíveis

com LV, presença de alguma intercorrência clínica no momento da inclusão e presença de anemia, leucopenia ou plaquetopenia também não mostraram associações com a positividade deste teste sorológico.

**Tabela 12-** Características associadas à reatividade do teste ELISA rK28 em 240 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril de 2015 a março de 2016).

	ELISA rK28		p	OR	IC (95%)
	Reagente	Não reagente			
<b>Idade, mediana</b>	52,00	46,00	0,151*	—	—
<b>Sexo, n</b>					
Masculino	4	168	0,677**	0,79	0,14 - 4,40
Feminino	2	66			
<b>Epidemiologia para LV, n</b>					
Sim	3	89	0,678**	1,63	0,32 - 8,25
Não	3	145			
<b>Tempo de diagnóstico da infecção pelo HIV (anos), mediana</b>	15,00	15,00	0,759*	—	—
<b>Contagem de linfócitos T CD4+ (células/mm<sup>3</sup>), mediana</b>	615,0	603,0	0,737*	—	—
<b>Contagem de linfócitos T CD4+ (células/mm<sup>3</sup>), n</b>					
<200	2	25	0,138**	4,18	0,73 - 24,00
≥200	4	209			
<b>Uso regular de TARV, n</b>					
Sim	4	207	0,156**	0,26	0,05 - 1,49
Não	2	27			
<b>Uso de inibidor de protease, n</b>					
Sim	3	116	1,000**	1,02	0,20 - 5,15
Não	3	118			
<b>Presença de infecção oportunista prévia, n</b>					
Sim	1	52	1,000**	0,70	0,07 - 6,13
Não	5	182			
<b>Diagnóstico de tuberculose atual, n</b>					
Sim	1	8	0,207**	5,65	0,59 - 54,17
Não	5	226			

Continua

**Tabela 12-** Características associadas à reatividade do teste ELISA rK28 em 240 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril de 2015 a março de 2016). (Continuação)

	ELISA rK28		p	OR	IC (95%)
	Reagente	Não reagente			
<b>Diagnóstico de tuberculose prévio, n</b>					
Sim	2	39	0,273**	2,50	0,44 - 14,13
Não	4	195			
<b>Presença de comorbidades, n</b>					
Sim	3	106	1,000**	1,21	0,24 - 6,11
Não	3	128			
<b>Sintomas compatíveis com LV no momento da inclusão, n</b>					
Sim	0	18	1,000*	–	–
Não	6	216			
<b>Intercorrência clínica em tratamento no momento da inclusão, n</b>					
Sim	1	27	0,53**	1,533	0,17 - 13,63
Não	5	207			
<b>Presença de anemia e/ou leucopenia e/ou plaquetopenia, n</b>					
Sim	2	56	0,634**	1,59	0,28 - 8,91
Não	4	178			

OR = Odds Ratio; IC = Intervalo de confiança; n= número; \* Mann Whitney; \*\* Teste exato de Fisher

## 5.6 Reação de imunofluorescência indireta

Os dados referentes aos resultados de RIFI foram separados em dois grupos (RIFI reagente e RIFI não-reagente) e analisados segundo às variáveis clínicas, laboratoriais e epidemiológicas (Tabela 13). Não houve diferença estatística em relação qualquer às seguintes variáveis analisadas: faixa etária, proporção por gênero nos dois grupos, epidemiologia para LV, tempo de diagnóstico da infecção pelo HIV, uso regular de TARV, uso de inibidor de protease, doenças oportunistas prévias, diagnóstico atual de tuberculose. Em relação às características clínicas apresentadas pelos pacientes no momento

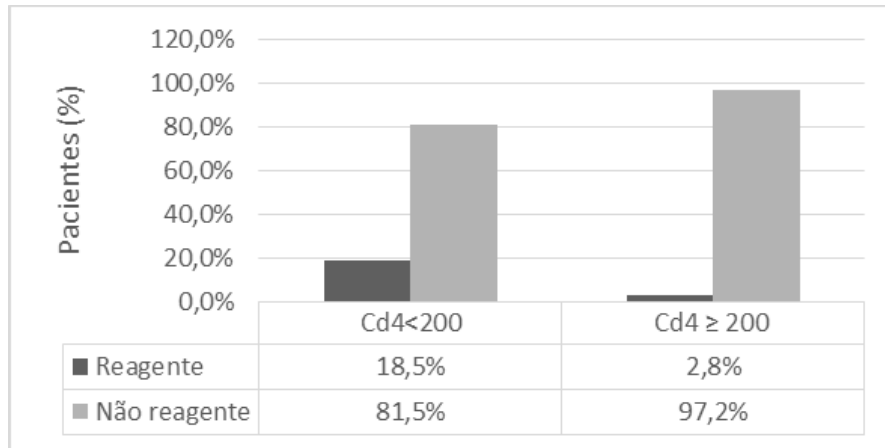
da inclusão, a presença de comorbidades, presença de sintomas compatíveis com LV, presença de alguma intercorrência clínica no momento da inclusão e presença de anemia, leucopenia ou plaquetopenia também não mostraram associações com a positividade deste teste sorológico. A variável “contagem de linfócitos T CD4+” foi categorizada em valores abaixo de 200 células/mm<sup>3</sup> e valores maiores ou iguais a 200 células/mm<sup>3</sup>. Em relação a esta comparação, observou-se menor proporção de pacientes com testes sorológicos reagentes entre os que tinham contagem de linfócitos T CD4+ maior ou igual a 200 células/mm<sup>3</sup>, do que naqueles que tinham contagem de linfócitos T CD4 + menor que 200 células/mm<sup>3</sup> (p = 0,004) (Gráfico 13). Também se observou maior proporção de testes reagentes naqueles pacientes com história prévia de tuberculose (p = 0,024). (Gráfico 14).

**Tabela 13-** Características associadas à reatividade do teste RIFI em 240 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril de 2015 a março de 2016)

	RIFI		p	OR	IC (95%)
	Reagente	Não reagente			
<b>Idade, média</b>	45,18	46,58	0,649*	—	—
<b>Sexo, n</b>					
Masculino	8	164	1,000**	1,06	0,28 - 4,11
Feminino	3	65			
<b>Epidemiologia para LV, n</b>					
Sim	5	87	0,753**	1,36	0,40 - 4,59
Não	6	142			
<b>Tempo de diagnóstico da infecção pelo HIV (anos), mediana</b>	17,00	14,00	0,199***	—	—
<b>Contagem de linfócitos T CD4+ (células/mm<sup>3</sup>), mediana</b>	415,0	554,0	0,170***	—	—
<b>Contagem de linfócitos T CD4+ (células/mm<sup>3</sup>)</b>					
<200	5	22	0,004**	7,84	2,21 - 27,81
≥200	6	207			
<b>Uso regular de TARV, n</b>					
Sim	8	203	0,134**	0,34	0,09 - 1,37
Não	3	26			
<b>Uso de inibidor de protease, n</b>					
Sim	3	116	0,216**	0,37	0,10 - 1,41
Não	8	113			
<b>Presença de infecção oportunista prévia, n</b>					
Sim	2	51	1,000**	0,78	0,16 - 3,71
Não	9	178			
<b>Diagnóstico de tuberculose atual, n</b>					
Sim	1	8	0,349**	2,76	0,31 - 24,29
Não	10	221			
<b>Diagnóstico de tuberculose prévio, n</b>					
Sim	5	36	0,024**	4,47	1,29 - 15,43
Não	6	193			
<b>Presença de comorbidades, n</b>					
Sim	6	125	1,000**	1,00	0,30 - 3,37
Não	5	104			
<b>Sintomas compatíveis com LV no momento da inclusão, n</b>					
Sim	2	16	0,195**	2,96	0,59 - 14,87
Não	9	213			
<b>Intercorrência clínica em tratamento no momento da inclusão, n</b>					
Sim	3	25	0,124**	3,06	0,76 - 12,29
Não	8	204			
<b>Presença de anemia e/ou leucopenia e/ou plaquetopenia, n</b>					
Sim	3	55	0,730**	1,19	0,30 - 4,63
Não	8	174			

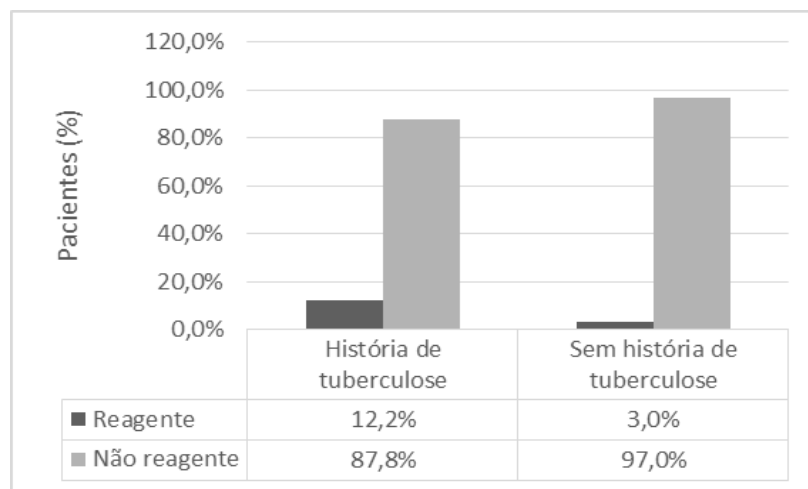
OR = Odds Ratio; IC = Intervalo de confiança; n= número; \* Teste t de Student; \*\* Teste exato de Fisher; \*\*\*Mann Whitney

**Gráfico 13-** Distribuição de 240 pacientes vivendo com HIV/aids atendidos no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril/2015 a março/2016), categorizados pela reatividade de RIFI e valor de contagem de linfócitos T CD4+ (células/mm<sup>3</sup>)



\*Teste exato de Fisher aplicado.  $p=0,004$ .

**Gráfico 14 -** Distribuição de 240 pacientes vivendo com HIV/aids atendidos no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril/2015 a março/2016), categorizados pela reatividade de RIFI e presença de histórico de tuberculose



Teste exato de Fisher aplicado.  $p=0,024$

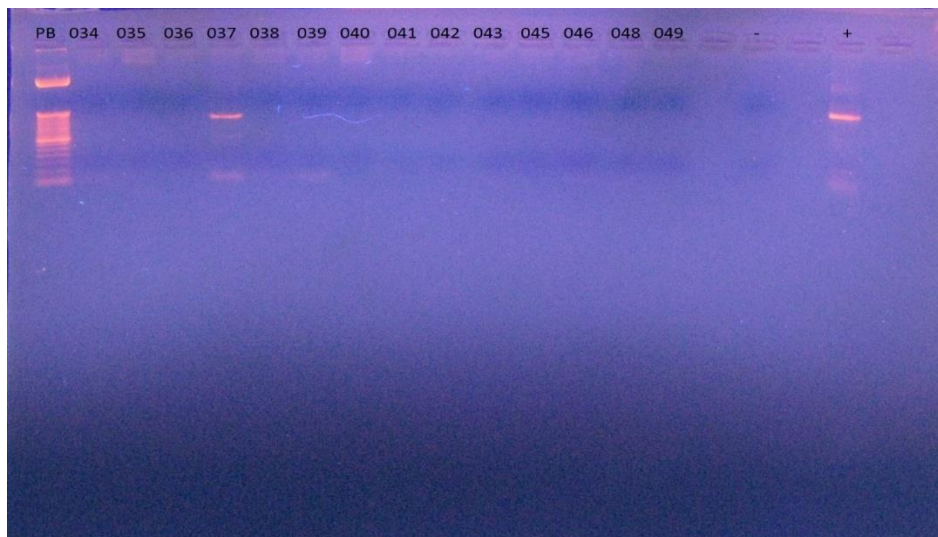


### 5.7 Teste de aglutinação direta – DAT

Nenhum indivíduo apresentou DAT reagente nas amostras testadas. Os títulos variaram de 1:50 a 1:800, sendo 20 amostras com título 1:50, 151 com título 1:100, 58 com título 1:200, 10 com título 1:400 e uma com título 1:800.

### 5.8 Reação em cadeia da polimerase – alvo kDNA (PCR k-DNA)

Os dados referentes aos resultados de PCR kDNA foram separados em dois grupos (PCR kDNA positivo e PCR kDNA negativo) e analisados segundo às variáveis clínicas, laboratoriais e epidemiológicas (Tabela 14). A Figura 3 mostra a foto da PCR em que uma das amostras foi positiva (amostra 037).



**Figura 3-** Eletroforese em Gel de agarose 1% com os produtos amplificados do minicírculo do kDNA com 720pb. pb: peso molecular (100 pb); 034 a 049: amostras de pacientes; (-): controle negativo; (+): controle positivo: DNA de promastigota de *Leishmania (L.) infantum chagasi*.

Não houve diferença estatística em relação a qualquer uma das variáveis analisadas: faixa etária, proporção por gênero nos dois grupos, epidemiologia para LV, tempo de diagnóstico da infecção pelo HIV, contagem de linfócitos T CD4+, uso regular de TARV, uso de inibidor de protease, doenças oportunistas prévias, diagnóstico prévio ou atual de tuberculose. Em relação às características clínicas apresentadas pelos pacientes no momento da inclusão, a presença de comorbidades, presença de sintomas compatíveis com LV, presença de alguma intercorrência clínica no momento da inclusão e presença de anemia, leucopenia ou plaquetopenia também não mostraram associações com a positividade deste teste sorológico.

**Tabela 14-** Características associadas à positividade da PCR k-DNA em 240 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril de 2015 a março de 2016)

	kDNA PCR		p	OR	IC (95%)
	Positivo	Negativo			
<b>Idade, mediana</b>	41,00	46,00	0,383*	—	—
<b>Sexo, n</b>					
Masculino	3	169	1,000**	1,19	0,12 - 11,64
Feminino	1	67			
<b>Epidemiologia para LV, n</b>					
Sim	2	90	0,639**	1,62	0,22 - 11,73
Não	2	146			
<b>Tempo de diagnóstico da infecção pelo HIV (anos), mediana</b>	16,50	15,00	0,396*	—	—
<b>Contagem de linfócitos T CD4+ (células/mm<sup>3</sup>), mediana</b>	668,5	541,5	0,749*	—	—
<b>Contagem de linfócitos T CD4+ (células/mm<sup>3</sup>), n</b>					
<200	0	27	1,000*	—	—
≥200	4	209			
<b>Uso regular de TARV, n</b>					
Sim	3	208	0,405**	0,40	0,04 - 4,20
Não	1	28			

Continua

**Tabela 14-** Características associadas à positividade da PCR k-DNA em 240 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril de 2015 a março de 2016) (Continuação)

	kDNA PCR		p	OR	IC (95%)
	Positivo	Negativo			
<b>Uso de inibidor de protease, n</b>					
Sim	3	116	0,368**	3,10	0,32 - 30,28
Não	1	120			
<b>Presença de infecção oportunista prévia, n</b>					
Sim	1	52	1,000**	1,18	0,12 - 11,58
Não	3	184			
<b>Diagnóstico de tuberculose atual, n</b>					
Sim	0	9	1,000**	–	–
Não	4	227			
<b>Diagnóstico de tuberculose prévio, n</b>					
Sim	1	40	0,530**	1,63	0,17 - 16,12
Não	3	196			
<b>Presença de comorbidades, n</b>					
Sim	2	107	1,000**	1,21	0,18 - 8,71
Não	2	129			
<b>Sintomas compatíveis com LV no momento da inclusão, n</b>					
Sim	0	18	1,000**	–	–
Não	4	218			
<b>Intercorrência clínica em tratamento no momento da inclusão, n</b>					
Sim	0	28	1,000**	–	–
Não	4	208			
<b>Presença de anemia e/ou leucopenia e/ou plaquetopenia, n</b>					
Sim	0	58	0,575**	–	–
Não	4	178			

OR = Odds Ratio; IC = Intervalo de confiança; n= número; \* Mann Whitney; \*\* Teste exato de Fisher

## 5.9 Reação em cadeia da polimerase – ITS-1(PCR ITS-1)

Os dados referentes aos resultados de PCR ITS-1 foram separados em dois grupos (PCR ITS-1 positivo e PCR ITS-1 negativo) e analisados segundo às variáveis clínicas, laboratoriais e epidemiológicas (Tabela 15). A Figura 4 mostra a foto da PCR em que uma das amostras foi positiva (amostra 171).

Não houve diferença estatística em relação a qualquer uma das variáveis analisadas: faixa etária, proporção por gênero nos dois grupos, epidemiologia para LV, tempo de diagnóstico da infecção pelo HIV, contagem de linfócitos T CD4+, uso regular de TARV, uso de inibidor de protease, doenças oportunistas prévias, diagnóstico prévio ou atual de tuberculose. Em relação às características clínicas apresentadas pelos pacientes no momento da inclusão, a presença de comorbidades, presença de sintomas compatíveis com LV, presença de alguma intercorrência clínica no momento da inclusão e presença de anemia, leucopenia ou plaquetopenia também não mostraram associações com a positividade deste teste sorológico.

**Tabela 15** - Características associadas à positividade da PCR ITS-1 em 240 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril de 2015 a março de 2016)

	ITS-1 PCR		p	OR	IC (95%)
	Positivo	Negativo			
<b>Idade, mediana</b>	46,50	46,00	0,872*		
<b>Sexo, n</b>					
Masculino	10	162	0,066**		
Feminino	0	68			
<b>Epidemiologia para LV, n</b>					
Sim	3	89	0,745**	0,68	0,17 - 2,70
Não	7	141			
<b>Tempo de diagnóstico da infecção pelo HIV (anos), mediana</b>	9,50	15,00	0,407**	—	—
<b>Contagem de linfócitos T CD4+ (células/mm<sup>3</sup>), média</b>	659,4	564,5	0,352***		
<b>Contagem de linfócitos T CD4+ (células/mm<sup>3</sup>)</b>					
<200	0	27	0,608**	—	—
≥200	10	203			
<b>Uso regular de TARV, n</b>					
Sim	9	202	1,000**	1,25	0,15 - 10,23
Não	1	28			

Continua

**Tabela 15** - Características associadas à positividade da PCR ITS-1 em 240 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril de 2015 a março de 2016) (Continuação)

	ITS-1 PCR		p	OR	IC (95%)
	Positivo	Negativo			
<b>Uso de inibidor de protease, n</b>					
Sim	4	115	0,749**	0,67	0,18 - 2,43
Não	6	115			
<b>Presença de infecção oportunista prévia, n</b>					
Sim	1	52	0,696**	0,38	0,05 - 3,07
Não	9	178			
<b>Diagnóstico de tuberculose atual, n</b>					
Sim	0	9	1,000**	–	–
Não	10	221			
<b>Diagnóstico de tuberculose prévio, n</b>					
Sim	0	41	0,219**	0,22	0,01 - 3,79
Não	10	189			
<b>Presença de comorbidades, n</b>					
Sim	4	104	1,000**	0,81	0,22 - 2,94
Não	6	126			
<b>Sintomas compatíveis com LV no momento da inclusão, n</b>					
Sim	1	17	0,549**	1,39	0,17 to 11,65
Não	9	213			
<b>Intercorrência clínica em tratamento no momento da inclusão, n</b>					
Sim	0	28	0,611**	0,338**	0,02 - 5,94
Não	10	202			
<b>Presença de anemia e/ou leucopenia e/ou plaquetopenia, n</b>					
Sim	0	58	0,124**	0,14	0,01 - 2,435
Não	10	172			

OR = Odds Ratio; IC = Intervalo de confiança; \* Mann Whitney; \*\* Teste exato de Fisher; \*\*\* Teste t de Student



**Figura 4-** Eletroforese em Gel de agarose 2% com os produtos amplificados do ITS-1 com 300-350pb. M: peso molecular (100 pb); Amostras 169, 170, 171, 173, 174, 175, 176, 178, 179, 180, 181, 182, 184, 185. CP: controle positivo (DNA de promastigota de *Leishmania (Leishmania) infantum*); CN: controle negativo.

#### 5.10 Concordância entre os testes diagnósticos

A comparação entre os testes demonstrou baixa concordância de acordo com o índice *Kappa*. A concordância foi considerada “nenhuma” ou “ruim” ( $kappa < 0,2$ ) para as comparações entre todos os testes diagnósticos, exceto para comparação entre ELISA *Leptomonas* e RIFI (concordância moderada –  $kappa = 0,479$ ). Nenhum paciente apresentou todos os testes diagnósticos positivos e 64 pacientes tinham apenas um teste diagnóstico positivo. Dos 60 pacientes com ELISA *L. major*-like reagentes, três apresentavam também RIFI e ELISA *Leptomonas* positivas, um apresentava ELISA rK28 e PCR kDNA positivas e um paciente apresentava RIFI, ELISA *Leptomonas* e PCR ITS-1 positivas. Este último não apresentava sintomas sugestivos de LV e era proveniente de área de transmissão de LV. Dentre os pacientes com ELISA *L. major*-like negativa, três apresentavam RIFI positiva e

um apresentava RIFI e ELISA *Leptomonas* positiva. Os demais pacientes com algum teste positivo apresentavam somente um ou dois testes positivos. As tabelas 16, 17, 18, 19, 20 e 21 mostram as concordâncias segundo cada comparação realizada.

**Tabela 16-** Concordância entre os testes diagnósticos realizados nas 240 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril de 2015 a março de 2016): ELISA *L. major*-like em relação à ELISA *Leptomonas*, ELISA rK39, ELISA rK28, RIFI, PCR kDNA, PCR ITS-1

Técnicas	ELISA <i>Leptomonas</i>		Total (n)	Kappa
	Positivo (n)	Negativo (n)		
<b>ELISA <i>L. major</i>-like</b>				
Positivo (n)	5	55	60	0,085
Negativo (n)	4	176	180	
Total (n)	9	231		
<b>ELISA rK39</b>				
	Positivo (n)	Negativo (n)		
Positivo (n)	1	59	60	0,008
Negativo (n)	2	178	180	
Total (n)	3	237		
<b>ELISA rK28</b>				
	Positivo (n)	Negativo (n)		
Positivo (n)	3	57	60	0,048
Negativo (n)	3	177	180	
Total (n)	6	234		
<b>RIFI</b>				
	Positivo (n)	Negativo (n)		
Positivo (n)	7	53	60	0,130
Negativo (n)	4	176	180	
Total (n)	11	229		
<b>PCR kDNA</b>				
	Positivo (n)	Negativo (n)		
Positivo (n)	1	59	60	0,000
Negativo (n)	3	177	180	
Total (n)	4	236		
<b>PCR ITS-1</b>				
	Positivo (n)	Negativo (n)		
Positivo (n)	2	58	60	-0,015
Negativo (n)	8	172	180	
Total (n)	10	230		

**Tabela 17-** Concordância entre os testes diagnósticos realizados nas 240 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril de 2015 a março de 2016): RIFI em relação à ELISA *Leptomonas*, ELISA rK39, ELISA rK28, PCR kDNA, PCR ITS-1

Técnicas	ELISA <i>Leptomonas</i>			Kappa
	Positivo (n)	Negativo (n)	Total (n)	
<b>RIFI</b>				
Positivo (n)	5	6	11	0,478
Negativo (n)	4	225	229	
Total (n)	9	231		
<b>ELISA rK39</b>				
	Positivo (n)	Negativo (n)	Total (n)	-0,020
Positivo (n)	0	11	11	
Negativo (n)	3	226	229	
Total (n)	3	237		
<b>ELISA rK28</b>				
	Positivo (n)	Negativo (n)	Total (n)	-0,033
Positivo (n)	0	11	11	
Negativo (n)	6	223	229	
Total (n)	6	234		
<b>PCR kDNA</b>				
	Positivo (n)	Negativo (n)	Total (n)	-0,025
Positivo (n)	0	11	11	
Negativo (n)	4	225	229	
Total (n)	4	236		
<b>PCR ITS-1</b>				
	Positivo (n)	Negativo (n)	Total (n)	0,054
Positivo (n)	1	10	11	
Negativo (n)	9	220	229	
Total (n)	10	230		



**Tabela 18-** Concordância entre os testes diagnósticos realizados nas 240 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril de 2015 a março de 2016): ELISA *Leptomonas* em relação à ELISA rK39, ELISA rK28, PCR kDNA, PCR ITS-1

Técnicas	ELISA rK39		Total (n)	Kappa
	Positivo (n)	Negativo (n)		
<b>ELISA <i>Leptomonas</i></b>				
Positivo (n)	0	9	9	-0,019
Negativo (n)	3	228	231	
Total (n)	3	237		
<b>ELISA rK28</b>				
	Positivo (n)	Negativo (n)		
Positivo (n)	0	9	9	-0,031
Negativo (n)	6	225	231	
Total (n)	6	234		
<b>PCR kDNA</b>				
	Positivo (n)	Negativo (n)		
Positivo (n)	0	9	9	-0,024
Negativo (n)	4	227	231	
Total (n)	4	236		
<b>PCR ITS-1</b>				
	Positivo (n)	Negativo (n)		
Positivo (n)	1	8	9	0,068
Negativo (n)	9	222	231	
Total (n)	10	230		

**Tabela 19-** Concordância entre os testes diagnósticos realizados nas 240 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril de 2015 a março de 2016): ELISA rK39 em relação à ELISA rK28, PCR kDNA e PCR ITS-1

Técnicas	ELISA rK28			Kappa
	Positivo (n)	Negativo (n)	Total (n)	
<b>ELISA rK39</b>				
Positivo (n)	0	3	3	-0,017
Negativo (n)	6	231	237	
Total (n)	6	234		
<b>PCR kDNA</b>				
	Positivo (n)	Negativo (n)	Total (n)	
Positivo (n)	0	3	3	-0,014
Negativo (n)	4	233	237	
Total (n)	4	236		
<b>PCR ITS-1</b>				
	Positivo (n)	Negativo (n)	Total (n)	
Positivo (n)	0	3	3	-0,020
Negativo (n)	10	227	237	
Total (n)	10	230		

**Tabela 20-** Concordância entre os testes diagnósticos realizados nas 240 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril de 2015 a março de 2016): ELISA rK28 em relação à PCR kDNA e PCR ITS-1

Técnicas	PCR kDNA			Kappa
	Positivo (n)	Negativo (n)	Total (n)	
<b>ELISA rK28</b>				
Positivo (n)	1	5	6	0,184
Negativo (n)	3	231	234	
Total (n)	4	236		
<b>PCR ITS-1</b>				
	Positivo (n)	Negativo (n)	Total (n)	
Positivo (n)	0	6	6	-0,032
Negativo (n)	10	224	234	
Total (n)	10	230		

**Tabela 21-** Concordância entre os testes diagnósticos realizados nas 240 pessoas vivendo com HIV/aids acompanhadas no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (abril de 2015 a março de 2016): PCR kDNA em relação à PCR ITS-1

Técnicas	PCR ITS-1		Total (n)	Kappa
	Positivo (n)	Negativo (n)		
<b>PCR kDNA</b>				
Positivo (n)	0	3	3	-0,02
Negativo (n)	10	227	237	
Total (n)	10	230		

## **6. Discussão**

---

Coinfecção LV/HIV tem emergido como um grande desafio para o controle de leishmaniose em todo mundo, especialmente no que se refere à forma visceral da doença (Alvar *et al.*, 1997; Alvar *et al.*, 2008; World Health Organization, 2010). Em países da África oriental, a magnitude do problema se torna ainda maior, com estudos mostrando cerca de 38% dos pacientes com leishmaniose visceral também acometidos pela infecção pelo HIV (Hurissa *et al.*, 2010; Van Griensven *et al.*, 2014). No Brasil, a progressão geográfica da infecção pelo HIV para áreas rurais e a urbanização da leishmaniose ao longo das últimas décadas certamente contribuiu para o aumento da magnitude deste problema (Nascimento *et al.*, 2011; Lindoso *et al.*, 2014), com necessidade de estudos epidemiológicos e clínicos que abordem este tema. Este estudo teve por objetivo principal determinar a frequência da infecção por *Leishmania* spp. em uma população de pacientes vivendo com HIV/aids atendidos no Instituto de Infectologia Emílio Ribas, através de testes sorológicos e moleculares.

A população analisada consistiu de 240 pessoas com diagnóstico de infecção pelo HIV, atendidas no Instituto de Infectologia Emílio Ribas. Na amostra avaliada, houve predomínio do sexo masculino (71,6%), sendo, portanto, uma razão de sexos (masculino/feminino) de 2,5. Dados do Ministério da Saúde do Brasil (Boletim Epidemiológico AIDS 2015) demonstram que no período de 1980 até 2003 houve um aumento na participação de mulheres nos casos de aids. No Estado de São Paulo, em estudo publicado em 2002, Santos e colaboradores (2002) evidenciaram um aumento expressivo no número de casos entre mulheres entre os anos de 1984 até 1997, com manutenção da relação em torno de 2:1 até 1999 (Santos NJS, et al, 2002). No Brasil, no período de 2004 a 2008, a razão de sexos, expressa pela relação entre o

número de casos de aids em homens e mulheres, manteve-se em 15 casos em homens para cada 10 casos em mulheres. No entanto, a partir de 2009, observou-se uma redução no número de casos em mulheres e aumento no número de casos de aids em homens, sendo este dado mais marcante nas regiões Sudeste e Centro-Oeste. Em 2014, a razão de sexos na região Sudeste era de 22 casos de aids em homens para 10 em mulheres (2,2) (Boletim Epidemiológico AIDS 2015). A amostra avaliada apresenta uma relação acima da média apresentada para região Sudeste. É importante enfatizar que os dados do Ministério da Saúde tratam de casos confirmados de aids e não de infecção pelo HIV. A amostra analisada consistiu predominantemente de indivíduos assintomáticos, com mediana de contagem de linfócitos T CD4+ de 568,4 células/mm<sup>3</sup>. Além disso, 187 (77,9%) pacientes não tinham histórico de infecções oportunistas prévias. Apesar de não termos a informação sobre o nadir de valores de linfócitos T CD4+, é possível que muitos pacientes incluídos não tenham atingido os critérios diagnósticos de aids durante a evolução da doença e que, portanto, não tenham entrado na estatística nacional do Ministério da Saúde, que na maioria dos seus documentos considera os casos de aids e não de infecção pelo HIV para efeito de análise. Além disso, possivelmente cada município e instituição deve ter sua própria característica epidemiológica, com variações possíveis em relação à estatística regional e nacional.

Em relação ao histórico de exposição a áreas de transmissão de leishmaniose visceral, menos da metade dos pacientes (38,3%) apresentavam epidemiologia para LV conforme os critérios estabelecidos neste trabalho: ter nascido em área de transmissão para LV ou ter morado por mais de um ano

em município com registro de transmissão da doença, segundo dados do Ministério da Saúde. Além disso, não se observou relação entre histórico de epidemiologia para LV e positividade de qualquer um dos testes diagnósticos avaliados. Apesar de, no momento da inclusão, todos os pacientes terem sido questionados sobre os municípios de residência, esse tipo de abordagem tem risco de viés importante, pois depende da memória dos indivíduos convidados a participar. Além disso, as informações referentes aos municípios de transmissão referem-se aos últimos 15 anos e muitas cidades incluídas foram consideradas como de transmissão autóctone pela presença de somente um ou poucos casos registrados. Não foi possível estabelecer uma relação temporal de que, no momento em que o paciente residiu naquela localidade, havia transmissão de LV, o que certamente é um fator confundidor quando se analisa epidemiologia como fator de risco para positividade dos testes. Outras formas de transmissão de LV em pacientes infectados pelo HIV, especialmente uso de drogas injetáveis, têm grande importância epidemiológica em algumas partes do mundo, incluindo partes da Europa, África, Oriente Médio, Ásia e América do Norte (Strathdee e Stockman, 2010). Garrote *et al.* (2004) encontraram soroprevalência de 64% de anticorpos IgG anti-*Leishmania infantum* entre usuários de drogas injetáveis. Porém, a realidade nacional não é a mesma, com queda progressiva da incidência de usuários de drogas injetáveis infectados pelo HIV (Boletim Epidemiológico AIDS 2015). Enquanto na Europa Ocidental mais de 50% dos casos novos de infecção pelo HIV tem vínculo epidemiológico com uso de drogas injetáveis, dados da América Latina e Caribe apontam para menos de 2% de transmissão por essa via (UNAIDS,2016). A proporção de usuários de drogas injetáveis entre os

diagnosticados com aids vem diminuindo ao longo dos anos em todo o Brasil, com dados atuais em torno de 3,6% (Boletim Epidemiológico AIDS 2015). Dessa forma, pela baixa prevalência mesmo em indivíduos infectados pelo HIV, o uso de drogas injetáveis não é considerado como um forte fator epidemiológico de transmissão de leishmaniose, sendo a transmissão vetorial provavelmente a mais importante neste contexto.

Em relação ao local de nascimento, 57,5% dos indivíduos incluídos nasceram no Estado de São Paulo. Apesar de mais da metade dos indivíduos incluídos ter nascido em São Paulo e não ter epidemiologia documentada para LV, este trabalho demonstrou alta positividade para testes diagnóstico de leishmaniose, incluindo alguns altamente específicos para leishmaniose visceral. Segundo informações da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (Rangel et al, 2013), até dezembro de 2012 havia registro de 105 municípios com transmissão de LV: 70 municípios apresentaram casos humanos e caninos autóctones, cinco municípios registram somente casos humanos autóctones, sem detecção de autoctonia canina e 30 municípios apresentam somente transmissão canina. Ainda, a presença do vetor *Lutzomyia longipalpis* foi assinalada em 148 municípios, apontando para uma expansão tanto no número de casos como no risco de transmissão vetorial da doença no estado. A positividade dos métodos diagnósticos no presente trabalho aliada a essas informações epidemiológicas podem sugerir a necessidade de reforçar as medidas de controle já empregadas, diagnóstico precoce e prevenção da doença, especialmente no que se refere a indivíduos infectados pelo HIV, visto que, ao longo dos anos, se observa um aumento da área com casos autóctones de leishmaniose visceral no estado de São Paulo.



Além disso, não se tem informação de prevalência de infecção por *Leishmania* na população como um todo.

Não houve também relação da presença de sintomas compatíveis com o diagnóstico de LV e a positividade de qualquer um dos testes diagnósticos incluídos. Esses sintomas, selecionados pela Organização Mundial de Saúde para detecção de casos suspeitos de leishmaniose em áreas de risco de transmissão, são bastante inespecíficos, podendo relacionar-se ao diagnóstico de inúmeras doenças infecciosas ou não, também associadas à infecção pelo HIV. Dos 18 pacientes com pelo menos um desses sintomas (febre, esplenomegalia e o perda de peso), 17 também estão no grupo de pacientes que apresentavam intercorrência clínica diagnosticada no momento da inclusão no estudo. Conforme relatado, a principal doença em tratamento no momento da inclusão foi tuberculose (nove casos). A tuberculose pode apresentar-se clinicamente através de diversas formas, sendo a principal delas, tanto em pacientes imunocompetentes como naquelas infectados pelo HIV, a forma pulmonar da doença, que se caracteriza principalmente por febre, tosse e perda de peso (Campbell e Bah-Sow, 2006). Além disso, pacientes com infecção pelo HIV também podem apresentar formas extra-pulmonares, podendo evoluir com hepatomegalia e esplenomegalia, sendo essa doença um diagnóstico diferencial de LV (Shivakoti *et al.*, 2016). As outras doenças evidenciadas no grupo de pacientes incluídos podem também ser causa de febre e outros sintomas também relacionados à infecção por *Leishmania*. Deste modo, considerando a inespecificidade dos sintomas em questão, associado ao fato de que quase a totalidade dos pacientes com algum sintoma que poderia ser sugestivo de LV ter o diagnóstico de alguma doença atual em tratamento, é

provável que a falta de associação entre presença de sintomas e positividade dos testes diagnósticos deva-se à atribuição desses sintomas a outras doenças que não LV. Além disso, a infecção pelo HIV por si só pode estar relacionada a sintomas como febre e perda de peso, sendo difícil a distinção das manifestações clínicas relacionadas à própria atividade do vírus ou à presença de doenças oportunistas.

O mesmo pode ser discutido com relação às alterações laboratoriais do hemograma. Tipicamente a leishmaniose visceral caracteriza-se pela diminuição de todas as linhagens de células presentes no hemograma, gerando um achado de pancitopenia (anemia, leucopenia e plaquetopenia) (Pastorino *et al.*, 2002; World Health Organization, 2010; Van Griensven e Diro, 2012). Entretanto, essas alterações laboratoriais, individualmente ou em conjunto, estão presentes em grande parte das doenças oportunistas relacionadas ao HIV, como também podem ser consequência da própria infecção viral. Esses achados são comuns em paciente infectados pelo HIV e anemia é a manifestação hematológica mais comum, afetando de 63 a 95% dos indivíduos em diferentes cenários clínicos (Mijiti *et al.*, 2015). De Santis e colaboradores (2011), avaliando a presença de alterações hematológicas de 701 pacientes vivendo com HIV/aids, encontraram 37,5% de pacientes apresentando anemia, mais comum no grupo com contagem de linfócitos T CD4+ abaixo de 200 células/mm<sup>3</sup>, mas também presente no grupo com níveis de células TCD4+ acima de 200 células/mm<sup>3</sup>, em que esse achado laboratorial foi constatado em 29,4% dos casos. Dessa forma, mesmo com indivíduos predominantemente assintomáticos e com alta mediana de linfócitos T CD4+, é esperado que ocorram alterações no hemograma atribuíveis à infecção pelo

HIV, doenças associadas e efeitos adversos de alguns medicamentos da terapia antirretroviral, como por exemplo, zidovudina (De Santis *et al.*, 2011), não necessariamente correlacionando-se com positividade dos testes diagnósticos para leishmaniose.

Em relação à contagem de linfócitos T CD4+, observou-se que para os testes sorológicos ELISA *L.major-like*, ELISA *Leptomonas* e RIFI, houve uma maior positividade para o grupo de indivíduos com valor de linfócitos T CD4+ menor do que 200 células/mm<sup>3</sup>. Esse dado pode ser considerado, a princípio, surpreendente, tendo em vista que, conceitualmente, testes sorológicos tem menor sensibilidade para o diagnóstico de leishmaniose visceral plenamente manifesta em pacientes imunocomprometidos pelo HIV (Cota *et al.*, 2012; Van Griensven e Diro, 2012; Elmahallawy *et al.*, 2014). Esse conceito é aplicável a outras doenças infecciosas, especialmente verdade no estágio avançado da aids, em que a grave disfunção de linfócitos T e B desencadeia diminuição da produção de anticorpos específicos (Alvar *et al.*, 1997). O primeiro ponto a ser discutido é que o desempenho dos testes sorológicos foi avaliado pela maioria dos estudos para pacientes com doença plenamente manifesta, sendo comparado, na maioria das vezes aos métodos parasitológicos e moleculares de diagnóstico. Neste trabalho, nenhum paciente apresentou leishmaniose visceral confirmada e o comportamento dos testes sorológicos neste contexto não está claro na literatura, especialmente pela falta de um padrão-ouro que permita a comparação. Outro ponto importante é a especificidade dos testes em que foi demonstrada essa associação. Carranza-Tamayo (2006), em estudo avaliando 163 indivíduos com infecção pelo HIV, demonstrou associação de positividade de ELISA com antígeno bruto de *L. chagasi* e

intercorrência clínica. Apesar de não ter sido demonstrada no presente estudo associação entre intercorrência clínica no momento da admissão e algum teste sorológico positivo é possível que, no contexto na infecção pelo HIV, outros antígenos relativos a infecções latentes ou subclínicas possam ter interferido na positividade destes testes sorológicos. Outro ponto a ser considerado é a variabilidade de resposta humoral ao longo da vida dos pacientes infectados pelo HIV em resposta aos antígenos. No que se refere à infecção por *Leishmania*, a resposta sorológica pode estar relacionada à sequência temporal de aquisição dos agentes infecciosos (HIV e *Leishmania*) (Alvar *et al.*, 1997). Gradoni e colaboradores (1993) examinaram os soros de 28 pacientes com leishmaniose visceral e HIV com relação à produção de anticorpos IgG anti-*Leishmania* e compararam com 35 pacientes com leishmaniose visceral sem infecção pelo HIV (Gradoni *et al.*, 1993). Eles demonstraram que houve uma menor sensibilidade do método (RIFI) em pacientes com HIV (quatro dos 28 pacientes apresentaram sorologia negativa, enquanto todos os pacientes do grupo controle apresentaram sorologia positiva). Porém, a variabilidade de títulos nos pacientes com HIV foi muito maior, tendo alguns pacientes com HIV apresentado títulos muito acima daqueles do grupo controle (sem infecção pelo HIV). Esses dados corroboram o conceito de que pacientes infectados pelo HIV podem produzir resposta humoral com níveis de anticorpos superiores aos de pacientes sem infecção HIV, provavelmente em resposta a antígenos reconhecidos antes da infecção viral, quando era possível desencadear uma resposta imune adequada. Além disso, outra característica da infecção pelo HIV é a ativação inespecífica policlonal de células B, que tem como resultado um aumento geral da produção de IgG e que é mais evidente em estágios de

imunodepressão mais avançados (Alvar *et al.*, 1997; Shen e Tomaras, 2011). Neste estudo, não foi possível estabelecer uma associação temporal entre o contato com *Leishmania* e a aquisição do HIV. Porém, tendo em vista que os pacientes incluídos moravam em região sem transmissão de leishmaniose visceral, é mais provável que tenham entrado em contato com *Leishmania* antes da infecção pelo HIV, tenham tido habilidade de desencadear uma resposta humoral e, quando estimulados novamente, tenham apresentado uma produção exacerbada de anticorpos, o que pode ter interferido em uma maior positividade destes testes nos pacientes com valores de linfócitos T CD4+ menores que 200 células/mm<sup>3</sup>.

A prevalência da coinfeção *Leishmania*/HIV tem sido avaliada em estudos nacionais e ao redor do mundo, com importantes diferenças a depender do local analisado e dos métodos diagnósticos utilizados. O diagnóstico da infecção por *Leishmania* spp. em pacientes assintomáticos com infecção pelo HIV é um desafio e todos os dados de desempenho dos métodos diagnósticos referem-se a indivíduos com doença plenamente manifesta. Neste trabalho foi encontrada uma frequência da infecção por *Leishmania* spp. em pacientes infectados pelo HIV de 34,6%, valor maior do que o demonstrado em outros estudos realizados no Brasil, mas menor do que a encontrada em estudos internacionais. Em estudo realizado na Espanha, Garrote *et al.* (2004) evidenciaram uma soroprevalência de infecção por *Leishmania* spp. de 64%, discrepante em relação aos pacientes não infectados pelo HIV (4,9%), provavelmente relacionada à transmissão antroponótica devido ao uso de drogas injetáveis. Já Pineda e colaboradores (1998) encontraram, também na Espanha, frequência de 11%, analisando 291 pacientes infectados pelo HIV e

utilizando como método aspirado de medula óssea. Os dados de estudos nacionais são também discordantes. Em estudo realizado no Distrito Federal, região considerada endêmica para Leishmaniose Visceral, Carranza-Tamayo *et al.* (2009) avaliaram 163 indivíduos vivendo com HIV/aids e encontraram uma prevalência de infecção por *Leishmania* spp. de 16%. Em outro estudo também realizado em área endêmica no Brasil, Orsini *et al.* (2012) encontraram uma frequência de coinfeção *Leishmania*/HIV de 20,2%.

Outro ponto a se destacar é a baixa concordância entre os testes avaliados. Este achado também foi demonstrado em outros estudos realizados com pessoas assintomáticas, tanto infectadas pelo HIV, como imunocompetentes (Costa *et al.*, 2002; De Gouvea Viana *et al.*, 2008). Em estudo realizado em área urbana com transmissão de LV, Viana *et al.* (2008), avaliando 138 pessoas assintomáticas por meio de testes sorológicos e PCR, demonstraram que uma parte dos indivíduos com testes sorológicos positivos apresentavam PCR negativa, bem como, havia discrepância da positividade dos testes sorológicos entre si. Nos trabalhos incluindo pacientes com infecção pelo HIV realizados no Brasil, também foi evidenciada baixa concordância entre os métodos empregados (Carranza-Tamayo *et al.*, 2009; Orsini *et al.*, 2012). É possível que essas discrepâncias sejam explicadas pela história natural da infecção em humanos. O parasito pode ser encontrado em sangue periférico em um momento definido, seguido de uma resposta imune mediada por linfócitos T e com produção de anticorpos. Uma vez que esses fenômenos biológicos são contínuos, os indivíduos podem ser examinados em qualquer fase. Além disso, é possível que nessa população de indivíduos assintomáticos, existam baixos níveis de anticorpos circulantes, que podem ser

detectados por um ensaio e por outro não, tendo em vista a variedade de antígenos utilizada (Moreno *et al.*, 2006; De Gouvea Viana *et al.*, 2008).

Considerando os estudos nacionais, este trabalho encontrou uma frequência de coinfeção *Leishmania*/HIV maior do que a demonstrada nos outros trabalhos acima citados, sendo esses, diferentemente do nosso, realizados em áreas de transmissão autóctone de LV (Carranza-Tamayo *et al.*, 2009; Orsini *et al.*, 2012). Ainda nesses estudos, o teste com maior positividade em ambos os casos foi a técnica de ELISA usando antígenos brutos. As reações de ELISA utilizando antígenos brutos caracteristicamente são mais sensíveis do que outros métodos sorológicos, pois são capazes de detectar uma variedade de anticorpos dirigidos contra diversos componentes de antígenos solúveis e a especificidade depende do antígeno utilizado (Srivastava *et al.*, 2011; Elmahallawy *et al.*, 2014). O uso destes antígenos no diagnóstico sorológico da LV é dificultado pelas grandes variações de sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade dos testes. Essas limitações podem estar relacionadas principalmente às técnicas utilizadas para a extração de antígenos dos parasitos, que podem inadvertidamente alterar a estrutura primária das moléculas e comprometer as funções. ELISA e RIFI foram previamente comparados para o diagnóstico de leishmaniose cutânea e LV, concluindo-se que ELISA é ligeiramente mais sensível para este propósito, enquanto RIFI é mais específico (Slutzky e Greenblatt, 1979; Martin *et al.*, 1998; Barbosa-De-Deus *et al.*, 2002). No presente trabalho, encontrou-se uma alta frequência combinada, que pode ser atribuída especialmente à alta positividade do ELISA *L. major*-like (25,0%). Considerando somente os outros métodos diagnósticos e excluindo-se o ELISA *L. major*-like da análise, tem-se

uma frequência de 15% (36 pacientes), semelhante ao encontrado por Carranza-Tamayo e colaboradores (2009).

O antígeno *L. major*-like para o diagnóstico de leishmaniose visceral já foi avaliado em alguns trabalhos. Barbosa-de-Deus e colaboradores (2002), avaliando a sensibilidade e especificidade do ELISA usando antígenos de *L. major*-like (*in house*), demonstraram sensibilidade de 92% e especificidade de 100% para o diagnóstico de leishmaniose visceral. Entretanto, Celeste e colaboradores (2014), em trabalho que avaliou duas reações sorológicas encontraram 70,9% de especificidade para ELISA *L. major*-like, com reação cruzada com doença de Chagas. Segundo dados não publicados de Sanchez M.C.A., a especificidade do ELISA *L. major*-like em um estudo recente variou de 38,5 a 72,7%, dependendo da origem geográfica dos pacientes (comunicação pessoal).

Neste trabalho a maior positividade do ELISA *L. major*-like provavelmente deve ser atribuída à menor especificidade do teste em relação aos outros métodos utilizados. Este antígeno pode apresentar reatividade cruzada com diversas outras doenças, incluindo doença de Chagas. Além disso, os pacientes incluídos apresentavam infecção pelo HIV, que influencia as funções do sistema imune (Chowdhury e Silvestri, 2013; Sabin e Lundgren, 2013), permitindo a concomitância de diversas doenças infecciosas. Apesar de não ter sido encontrado neste trabalho relação entre positividade deste teste sorológico com presença de doença em atividade no momento da inclusão, é possível que os pacientes apresentassem infecções latentes ou subclínicas que possam ter ocasionado reações cruzadas e contribuído para a alta positividade deste teste.



O segundo ELISA analisado foi àquele utilizando antígeno de *Leptomonas seymouri* (ELISA *Leptomonas*). Os parasitos da família Trypanosomatidae incluem várias espécies responsáveis por uma ampla variedade de doenças em humanos e animais, dentre as quais destacam-se a doença de Chagas, causada pelo *Trypanosoma cruzi*, e a leishmaniose, causada por espécies do gênero *Leishmania* (Camargo, 1999; Stuart *et al.*, 2008). *Leptomonas seymouri*, também pertencente a esta família, é considerada não patogênica para humanos. Porém, devido sua afinidade com outras espécies da mesma família, tem sido investigada como base para antígenos no diagnóstico de doença de Chagas e leishmaniose (Lopes *et al.*, 1981; Ferreira *et al.*, 2014). Em trabalho que analisou a similaridade antigênica de seis tripanossomatídeos em relação a *L. chagasi*, Ferreira e colaboradores (2014) demonstraram 100% de reação cruzada dos antígenos de *Leptomonas seymouri* com soros de pacientes com leishmaniose visceral, o que sugere que este antígeno pode ser usado para o diagnóstico desta doença. Porém, apresentou as mesmas limitações de outros antígenos brutos: reatividade também para soros de pacientes com doença de Chagas e leishmaniose tegumentar. No presente estudo, a positividade do ELISA *Leptomonas* foi de 3,8%. Na amostra avaliada, nenhum paciente tinha histórico de leishmaniose tegumentar e, somente um paciente apresentava diagnóstico de doença de Chagas. Evidentemente, da mesma forma que para o ELISA *L. major-like*, existe possibilidade de reação cruzada com antígenos relacionados a outras doenças parasitárias, o que configura uma limitação deste método. Entretanto, é importante enfatizar, como também demonstrado por Ferreira e colaboradores (2014), que mesmo o antígeno bruto de *L. chagasi* também

apresenta reação cruzada com outras doenças, o que reafirma que a análise de ELISA usando antígenos brutos para estudos de prevalência deve ser cautelosa. O único paciente com diagnóstico de doença de Chagas, apresentou positividade no ELISA *L. major*-like, RIFI, ELISA *Leptomonas* e PCR ITS-1. É possível que tenha ocorrido reatividade cruzada com doença de Chagas. No entanto, o PCR ITS-1 positivo pode confirmar infecção por *Leishmania* e este paciente era proveniente de área de transmissão tanto para doença de Chagas como para LV (Porteirinhas-MG).

Ainda em relação aos testes ELISA, foram também avaliados os antígenos recombinantes K28 e K39, sendo este último o com menor positividade (1,3%). Esse dado é esperado, tendo em vista que a população do estudo é composta predominantemente por pacientes assintomáticos e antígeno rK39 tem demonstrado alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de LV em pacientes sintomáticos e caracteristicamente é relacionado à presença de doença plenamente manifesta. Badaró e colaboradores (1996), através da análise e comparação de soros de indivíduos com doença em atividade, apresentação subclínica e assintomáticos, demonstraram que positividade do teste foi fortemente associada com doença em atividade, enquanto pacientes assintomáticos tiveram níveis baixos ou indetectáveis de anticorpos anti-rK39. Braz e colaboradores (2002) também demonstraram que a detecção de rK39 através de ELISA é um método com boa sensibilidade (93%) e que tem a capacidade de distinguir entre pessoas com infecção assintomática por *L. chagasi* e aqueles com doença progressiva. Em outro estudo comparando ELISA rK39 e outros antígenos para detecção de infecção assintomática por *L. infantum*, Moreno e colaboradores (2009)

encontraram que este antígeno recombinante tinha menor sensibilidade de todos métodos sorológicos utilizados, comparando-se com métodos moleculares. Desse modo, apesar de existir a possibilidade de detecção deste antígeno em pacientes assintomáticos (Nascimento Mdo *et al.*, 2005), é esperado que, neste contexto, a positividade seja menor.

Em relação ao outro antígeno recombinante utilizado, o rK28, houve uma positividade de 2,5%, maior do que a apresentada pelo ELISA rK39. O ELISA usando antígeno rK28 tem sensibilidade e especificidade semelhantes para o diagnóstico de Leishmaniose Visceral em comparação ao ELISA utilizando rK39. Em estudo com 252 casos de LV com confirmação parasitológica realizado por Vaish e colaboradores (2012), observou-se sensibilidade de 99,6% e especificidade de 94,7%-100%, a depender se os controles eram ou não de áreas endêmicas, dados que foram semelhantes ao ELISA usando antígenos rK39. Testes rápidos utilizando o rK28 como antígeno também tem sido desenvolvidos, demonstrando alta especificidade (próxima de 100%) e sensibilidade acima de 92%, tanto para amostras de sangue total como para soro (Mukhtar *et al.*, 2015). Não existem dados em literatura que avaliem especificamente o desempenho dos métodos utilizando rK28 para o diagnóstico de LV em pacientes infectados pelo HIV. Considerando os dados aqui apresentados, com positividade acima da apresentada pelo ELISA rK39 e dados prévios de literatura que demonstram excelente especificidade, é possível que o ELISA rK28 seja um método promissor para o diagnóstico de infecção por *Leishmania* spp. em pacientes assintomáticos com HIV. Ainda, é possível que este método seja também útil no diagnóstico de LV plenamente manifesta em pacientes com HIV/aids, tendo em vista que o desempenho do

rK39 é abaixo do relatado em pacientes imunocompetentes, tanto em reações de ELISA (Moreno *et al.*, 2009), como em testes imunocromatográficos, com sensibilidade de 46,2% (Cota *et al.*, 2013).

Ainda se tratando de métodos sorológicos, as amostras foram também submetidas à RIFI, com positividade de 4,6%. RIFI é um exame recomendado pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico de LV (Manual LV MS 2014), tanto em pacientes imunocompetentes como naqueles coinfetados pelo HIV. Embora RIFI tenha se mostrado uma alternativa de diagnóstico para LV com boa sensibilidade e especificidade em estudos prévios (Duxbury e Sadun, 1964; Badaro *et al.*, 1983; Barbosa-De-Deus *et al.*, 2002), também é conhecidamente um método com possibilidade de reação cruzada, especialmente com soros de pacientes com doença de Chagas (Camargo e Rebonato, 1969). Badaró e colaboradores (1983), analisando 30 soros de pacientes com leishmaniose visceral encontraram uma sensibilidade de 100% e especificidade de 98% para os antígenos preparados com promastigotas de *Leishmania chagasi*, demonstrando também reatividade cruzada com soros de pacientes com doença de Chagas, porém com títulos menores de reatividade. Duxbury e colaboradores (1964), também avaliando 30 soros de pacientes com LV, encontraram sensibilidade de 90%, porém também evidenciaram reatividade cruzada ocasional com indivíduos com outras doenças bacterianas, fúngicas e parasitárias, incluindo doença de Chagas, infecção por *Mycobacterium lepreae* e micoses sistêmicas. No presente estudo, demonstrou-se associação de reatividade de RIFI e histórico de tuberculose prévio. Não há dados em literatura que suportem a informação de que há reatividade cruzada de soros de pacientes com tuberculose ou histórico prévio

da infecção com RIFI. Porém, tendo em vista o exposto acima, é possível que a exposição prévia a *Mycobacterium tuberculosis*, com histórico de doença manifesta tenha interferido na reatividade do teste.

Ao contrário das outras reações sorológicas já citadas, nenhum paciente teve amostra positiva para DAT. Este método comparado com outros métodos sorológicos, apresenta bom rendimento em pacientes infectados pelo HIV, com sensibilidade em torno de 81% e especificidade de 90% (Cota *et al.*, 2012). Este exame pode ser usado para o diagnóstico de formas ativas de LV em pacientes sem infecção pelo HIV e pode diagnosticar a infecção antes do aparecimento de manifestações clínicas, com declínio de títulos um ano após a cura (Patil *et al.*, 2012); (El Safi e Evans, 1989; Bimal *et al.*, 2005). Existem duas questões importantes relacionadas às características da amostra envolvida no presente trabalho. Primeiramente, os indivíduos incluídos eram predominantemente assintomáticos e nenhum deles teve o diagnóstico confirmado de leishmaniose visceral ou tinha história prévia desta doença, sendo que o desempenho deste teste, neste cenário, nunca foi avaliado e os dados de desempenho do teste se referem à presença de doença manifesta. Além disso, embora uma parte da amostra tenha histórico de exposição à área endêmica de LV, as pessoas incluídas atualmente residem em área sem transmissão da doença. Os estudos nos quais baseiam esses dados de sensibilidade e especificidade em pacientes com HIV foram conduzidos em regiões de alta endemicidade para LV (Hailu e Berhe, 2002; Ter Horst *et al.*, 2009; Cota *et al.*, 2012). É possível que o fato de estarmos analisando indivíduos assintomáticos, sem histórico de LV e sem exposição recente à *Leishmania* possa explicar este resultado, estando o teste relacionado

provavelmente à presença de doença ativa, cura ou exposição recente ao antígeno em áreas endêmicas.

Diferentes alvos genéticos têm sido usados para detecção de *Leishmania* sp., em estudos bastante heterogêneos e com objetivos diversos, de identificação de espécies a rastreamento clínico (Brewster *et al.*, 1998; Fraga *et al.*, 2010; Yehia *et al.*, 2012), o que dificulta a análise de qual método molecular seria o mais adequado para diagnóstico de leishmaniose. No presente trabalho, dois alvos foram utilizados para detecção de DNA de *Leishmania* nas amostras analisadas, com maior positividade de PCR ITS-1 em comparação ao PCR kDNA. Apesar de o PCR kDNA ser potencialmente mais sensível, devido à presença de um alto número de cópias por parasito (Rodgers *et al.*, 1990; De Paiva-Cavalcanti *et al.*, 2015), e deste alvo ter se mostrado mais sensível em outros estudos que compararam kDNA com ITS-1 (Bensoussan *et al.*, 2006; Mohammadiha *et al.*, 2013), não existem trabalhos comparando diretamente esses dois alvos em pacientes com HIV. Além disso, no presente estudo, não houve concordância entre os métodos moleculares e nenhum paciente teve as duas PCR positivas. Este dado corrobora o fato de que mais estudos comparativos são necessários para estabelecer qual seria o melhor alvo molecular a ser utilizado para o diagnóstico de leishmaniose ou se uma combinação de métodos seria a melhor alternativa.

Os métodos moleculares têm sido desenvolvidos com objetivo de complementar e criar alternativas para o diagnóstico de leishmaniose, bem como possibilidade de seguimento e controle laboratorial de cura (Pourabbas *et al.*, 2013; De Ruiter *et al.*, 2014; De Paiva-Cavalcanti *et al.*, 2015). Apesar do bom desempenho desses métodos para o diagnóstico de LV em pacientes com

doença clinicamente manifesta, com sensibilidade e especificidade em torno de 92% e 96%, respectivamente (Cota *et al.*, 2012), o uso desses métodos moleculares para o diagnóstico da infecção assintomática por *Leishmania* em estudos de frequência é outro ponto que deve ser discutido. Outros estudos que avaliaram essa frequência em pacientes com HIV assintomáticos também demonstraram baixa positividade deste método (1,8 e 6,3%) em comparação a alguns métodos sorológicos utilizados (Carranza-Tamayo *et al.*, 2009; Orsini *et al.*, 2012). Essa baixa detecção pode estar relacionada a um fenômeno de parasitemia ou, ao menos, circulação de DNA intermitente nestes pacientes sem sintomas. Assim, não há como tomar como base as referências de estudos que incluem pacientes com doença em atividade, em que deve haver um maior número de parasitos circulantes e, conseqüentemente, maior chance de detecção de DNA em sangue periférico.

A maior positividade da PCR ITS-1 em relação a PCR kDNA pode estar relacionada ao fato de que pacientes com algum grau de imunodepressão apresentarem uma maior periodicidade de circulação parasitária no organismo. Apesar de não ter sido associada à contagem de linfócitos TCD4+, a infecção pelo HIV interfere nas funções do sistema imune de forma qualitativa, com modificações no sistema imune independentes da relação quantitativa com a queda de CD4+ (Chinen e Shearer, 2002). A positividade mais alta de PCR ITS-1 neste contexto de pacientes, pode indicar que este alvo seja mais eficaz em identificar parasitemia intermitente neste grupo de indivíduos, dado que pode ser usado futuramente para triagem de indivíduos em risco de desenvolver leishmaniose manifesta. Essa informação seria de extrema importância nestes pacientes com imunodepressão avançada, que

conhecidamente apresentam formas mais graves, com mais complicações e maior mortalidade (Nascimento *et al.*, 2011; Albuquerque *et al.*, 2014).

Dessa forma, observou-se associação entre valores menores de linfócitos T CD4+ e, portanto, presença de imunodepressão avançada associada ao HIV em três métodos diagnósticos: ELISA *L. major*-like, ELISA *Leptomonas* e RIFI. Com relação à especificidade destes métodos, é importante considerar a possibilidade de reação cruzada com outros antígenos (Camargo e Rebonato, 1969; Slutzky e Greenblatt, 1979; Celeste *et al.*, 2014), o que pode ter interferido na positividade destes testes em pacientes com imunodepressão grave, e, portanto, mais suscetíveis à presença de outros antígenos ativados. Em relação às reações sorológicas com antígenos recombinantes, considerados altamente específicos, não se observou esta relação. Deste modo, levando em conta a especificidade variável destes métodos sorológicos, em relação ao tipo de antígeno utilizado e às condições laboratoriais em que são realizados, consideramos não ser possível propor o uso destes como métodos de rastreio de infecção assintomática por *Leishmania* em pacientes com HIV e valores de CD4+ menor que 200 células/mm<sup>3</sup>. Ainda, consideramos a prevalência de 34,6% superestimada, tendo em vista que o método com maior influência neste resultado é o que apresenta menor especificidade. Assim, julgamos que a frequência de infecção por *Leishmania* spp. de 15%, excluindo-se a positividade de ELISA *L. major*-like, representa um valor mais próximo do real, sendo também mais compatível com outros trabalhos publicados (Carranza-Tamayo *et al.*, 2009).



## **7. Conclusões**

---

O estudo avaliou a frequência da infecção por *Leishmania* spp. em pacientes atendidos no Instituto de Infectologia Emílio Ribas, localizado em área urbana e sem transmissão autóctone de leishmaniose. Considerando a positividade de qualquer método diagnóstico positivo foi de 34,6%. Excluindo-se a positividade de ELISA *L. major*-like, encontrou-se uma frequência de 15%.

Houve uma discrepância da positividade do método ELISA *L. major*-like e os demais métodos sorológicos. Dentre os métodos sorológicos usando antígenos recombinantes, houve maior positividade de ELISA rK28 em relação à ELISA rK39. Dentre os métodos moleculares, houve maior positividade de PCR ITS-1 em comparação a PCR kDNA. Houve uma concordância ruim entre os testes utilizados.

Considerando-se as variáveis analisadas, houve associação entre contagem de linfócitos T CD4+ e positividade dos seguintes testes diagnósticos: ELISA *L. major*-like, ELISA *Leptomonas* e RIFI. Houve associação de positividade de RIFI e histórico de tuberculose. Não foi demonstrada associação com histórico de contato com área de transmissão de LV, presença de sintomas ou outras características clínicas e laboratoriais para nenhum teste analisado.

## **8. Limitações do estudo**

A heterogeneidade de estudos avaliando o diagnóstico de leishmaniose em pacientes assintomáticos com HIV, dificulta a análise comparativa dos métodos empregados. Além disso, a baixa positividade de alguns métodos dificultou o estabelecimento de associações entre a positividade dos testes e as variáveis analisadas. Ainda, apesar de tratar-se de uma amostra recrutada em um grande centro de referência, é possível que ela não represente a população de pacientes com HIV/aids vivendo na cidade de São Paulo.

## **9. Referências Bibliográficas**

- Albuquerque LC, Mendonça IR, Cardoso PN, Baldaçara LR, Borges MR, Borges Jda C, et al. HIV/AIDS-related visceral leishmaniasis: a clinical and epidemiological description of visceralleishmaniasis in northern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2014;47(1):38-46.
- Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Cañavate C, Dedet JP, et al. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21(2):334-59.
- Alvar J, Cañavate C, Gutiérrez-Solar B, Jiménez M, Laguna F, López-Vélez R, et al. Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev.* 1997;10(2):298-319.
- Aransay AM, Scoulica E, Tselentis Y. Detection and identification of Leishmania DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66(5):1933-8.
- Badaró R, Benson D, Eulálio MC, Freire M, Cunha S, Netto EM, et al. rK39: cloned antigen of Leishmania chagasi that predicts active visceral leishmaniasis. *J Infect Dis.* 1996;173(3):758-61.
- Badaró R, Reed SG, Carvalho EM. Immunofluorescent antibody test in American visceral leishmaniasis: sensitivity and specificity of different morphological forms of two Leishmania species. *Am J Trop Med Hyg.* 1983;32(3):480-4.
- Barbosa-De-Deus R, Dos Mares-Guia ML, Nunes AZ, Costa KM, Junqueira RG, Mayrink W, et al. Leishmania major-like antigen for specific and sensitive serodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002;9(6):1361-6.
- Bensoussan E, Nasereddin A, Jonas F, Schnur LF, Jaffe CL, et al. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* 2006;44(4):1435-9.
- Bimal S, Das VN, Sinha PK, Gupta AK, Verma N, Ranjan A, et al. Usefulness of the direct agglutination test in the early detection of subclinical Leishmania donovani infection: a community-based study. *Ann Trop Med Parasitol.* 2005;99(8):743-9
- Boelaert M, Rijal S, Regmi S, Singh R, Karki B, Jacquet D, et al. A comparative study of the effectiveness of diagnostic tests for visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2004;70(1):72-7
- Boletim epidemiológico. HIV/aids, [www.aids.gov.br](http://www.aids.gov.br), 2015. Acesso em: 05-02.
- Brasil. Ministério da Saúde. Critérios de definição de casos de aids em adultos e crianças. Brasília (DF): Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de DST e Aids ; 2003

Brasil. Critérios de definição de casos de aids em adultos e crianças. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de DST e Aids 2004.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção *Leishmania*-HIV. Brasília: Editora do Ministério da Saúde: 106 p. 2011.

Brasil. Ministério da Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília (DF): Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica; 2014.

Brasil. Ministério da Saúde. Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção *leishmania*-HIV. Brasília (DF): Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis; 2015.

Brasil. Ministério da Saúde. Boletim epidemiológico HIV – Aids. Brasília (DF). 2015;4(1).

Braz RF, Nascimento ET, Martins DR, Wilson ME, Pearson RD, Reed SG, et al. The sensitivity and specificity of *Leishmania* *hagasi* recombinant K39 antigen in the diagnosis of American visceral leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;67(4):344-8.

Brewster S, Aslett M, Barker DC. Kinetoplast DNA minicircle database. *Parasitol Today.* 1998;14(11):437-8.

Camargo EP. *Phytomonas* and other trypanosomatid parasites of plants and fruit. *Adv Parasitol.* 1999;42:29-112

Camargo ME, Rebonato C. Cross-reactivity in fluorescence tests for *Trypanosoma* and *Leishmania* antibodies. A simple inhibition procedure to ensure specific results. *Am J Trop Med Hyg.* 1969;18(4):500-5

Campbell IA, Bah-Sow O. Pulmonary tuberculosis: diagnosis and treatment. *BMJ.* 2006 ;332(7551):1194-7.

Carranza-Tamayo CO, de Assis TS, Neri AT, Cupolillo E, Rabello A, Romero GA. Prevalence of *Leishmania* infection in adult HIV/AIDS patients treated in a tertiary-level care center in Brasilia, Federal District, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2009;103(7):743-8

Celeste BJ, Arroyo Sanchez MC, Ramos-Sanchez EM, Castro LG, Lima Costa FA, Goto H. Recombinant *Leishmania infantum* heat shock protein 83 for the serodiagnosis of cutaneous, mucosal, and visceral leishmaniases. *Am J Trop Med Hyg.* 2014;90(5):860-5

- Chappuis F, Rijal S, Soto A, Menten J, Boelaert M. A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. *BMJ*. 2006 ;333(7571):723
- Chinen J, Shearer WT. Molecular virology and immunology of HIV infection. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;110(2):189-98.
- Chowdhury A, Silvestri G. Host-pathogen interaction in HIV infection. *Curr Opin Immunol*. 2013 Aug;25(4):463-9
- Costa CH, Stewart JM, Gomes RB, Garcez LM, Ramos PK, Bozza M, et al. Asymptomatic human carriers of *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg*. 2002;66(4):334-7.
- Cota GF, de Sousa MR, de Freitas Nogueira BM, Gomes LI, Oliveira E, Assis TS, et al. Comparison of parasitological, serological, and molecular tests for visceral leishmaniasis in HIV-infected patients: a cross-sectional delayed-type study. *Am J Trop Med Hyg*. 2013;89(3):570-7
- Cota GF, de Sousa MR, Demarqui FN, Rabello A. The diagnostic accuracy of serologic and molecular methods for detecting visceral leishmaniasis in HIV-infected patients: meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(5):e1665
- Cruz I, Nieto J, Moreno J, Cañavate C, Desjeux P, Alvar J. *Leishmania*/HIV co-infections in the second decade. *Indian J Med Res*. 2006;123(3):357-88.
- Cunningham J, Hasker E, Das P, El Safi S, Goto H, Mondal D, et al. A global comparative evaluation of commercial immunochromatographic rapid diagnostic tests for visceral leishmaniasis. *Clin Infect Dis*. 2012;55(10):1312-9
- de Gouvêa Viana L, de Assis TS, Orsini M, da Silva AR, de Souza GF, Caligiorno R, et al. Combined diagnostic methods identify a remarkable proportion of asymptomatic *Leishmania (Leishmania) chagasi* carriers who present modulated cytokine profiles. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2008;102(6):548-55
- de Paiva-Cavalcanti M, de Moraes RC, Pessoa-E-Silva R, Trajano-Silva LA, Gonçalves-de-Albuquerque Sda C, Tavares Dde H, et al. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. *Cell Biosci*. 2015;5:31
- de Ruiter CM, van der Veer C, Leeflang MM, Deborggraeve S, Lucas C, Adams ER. Molecular tools for diagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review and meta-analysis of diagnostic test accuracy. *J Clin Microbiol*. 2014;52(9):3147-55.
- De Santis GC, Brunetta DM, Vilar FC, Brandão RA, de Albernaz Muniz RZ, de Lima GM Hematological abnormalities in HIV-infected patients. *Int J Infect Dis*. 2011;15(12):e808-11



- Druzian AF, de Souza AS, de Campos DN, Croda J, Higa MG Jr, Dorval ME, et al. Risk Factors for Death from Visceral Leishmaniasis in an Urban Area of Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(8):e0003982
- Duxbury RE, Sadun EH. Fluorescent Antibody Test for the serodiagnosis of visceral LEISHMANIASIS. *Am J Trop Med Hyg*. 1964;13:525-9.
- el Safi SH, Evans DA. A comparison of the direct agglutination test and enzyme-linked immunosorbent assay in the sero-diagnosis of leishmaniasis in the Sudan. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1989;83(3):334-7.
- Elmahallawy EK, Sampedro Martinez A, Rodriguez-Granger J, Hoyos-Mallecot Y, Agil A, Navarro Mari JM, et al. Diagnosis of leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries*. 2014;8(8):961-72
- Ferreira LR, Kesper N, Teixeira MM, Laurenti MD, Barbieri CL, Lindoso JA, et al. New insights about cross-reactive epitopes of six trypanosomatid genera revealed that *Crithidia* and *Leptomonas* have antigenic similarity to *L. (L.) chagasi*. *Acta Trop*. 2014;131:41-6.
- Fraga TL, Brustoloni YM, Lima RB, Dorval ME, Oshiro ET, Oliveira J, et al. Polymerase chain reaction of peripheral blood as a tool for the diagnosis of visceral leishmaniasis in children. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010;105(3):310-3.
- Gani ZH, Hassan MK, Jassim AM . Sero-epidemiological study of visceral leishmaniasis in Basrah, Southern Iraq. *J Pak Med Assoc*. 2010 ;60(6):464-9
- Garrote JI, Gutiérrez MP, Izquierdo RL, Dueñas MA, Zarzosa P, Cañavate C, et al. Seroepidemiologic study of *Leishmania infantum* infection in Castilla-Leon, Spain. *Am J Trop Med Hyg*. 2004;71(4):403-6.
- Gradoni L, Scalone A, Gramiccia M. HIV-Leishmania co-infections in Italy: serological data as an indication of the sequence of acquisition of the two infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1993;87(1):94-6.
- Guimarães MC, Celeste BJ, Camargo ME, Diniz JM. Seroepidemiology of cutaneous leishmaniasis from Ribeira do Iguape Valley. IgM and IgG antibodies detected by means of an immunoenzymatic assay (ELISA). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1983;25(3):108-12
- Guimarães MC, Celeste BJ, de Castilho EA, Mineo JR, Diniz JM. Immunoenzymatic assay (ELISA) in mucocutaneous leishmaniasis, kala-azar, and Chagas' disease: an epimastigote *Trypanosoma cruzi* antigen able to distinguish between anti-*Trypanosoma* and anti-*Leishmania* antibodies. *Am J Trop Med Hyg*. 1981;30(5):942-7.
- Guimarães MC, Giovannini VL, Camargo M. Antigenic standardization for mucocutaneous leishmaniasis immunofluorescence test. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1974;16(3):145-8.

- Hailu A, Berhe N. The performance of direct agglutination tests (DAT) in the diagnosis of visceral leishmaniasis among Ethiopian patients with HIV co-infection. *Ann Trop Med Parasitol*. 2002;96(1):25-30.
- Harhay MO, Olliaro PL, Costa DL, Costa CH. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends Parasitol*. 2011;27(9):403-9.
- Hoshino-Shimizu S, Camargo ME, Nagasse TK. A stable polysaccharide-hemagglutination reagent for the diagnosis of acute or recent *Trypanosoma cruzi* infections. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1978;20(4):208-12.
- Hurissa Z, Gebre-Silassie S, Hailu W, Tefera T, Laloo DG, Cuevas LE, et al. Clinical characteristics and treatment outcome of patients with visceral leishmaniasis and HIV co-infection in northwest Ethiopia. *Trop Med Int Health*. 2010;15(7):848-55.
- Iqbal J, Hira PR, Saroj G, Philip R, Al-Ali F, Madda PJ, Sher A. Imported visceral leishmaniasis: diagnostic dilemmas and comparative analysis of three assays. *J Clin Microbiol*. 2002;40(2):475-9.
- Jarvis JN, Lockwood DN. Clinical aspects of visceral leishmaniasis in HIV infection. *Curr Opin Infect Dis*. 2013;26(1):1-9.
- Kumar R, Pai K, Pathak K, Sundar S. Enzyme-linked immunosorbent assay for recombinant K39 antigen in diagnosis and prognosis of Indian visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2001 ;8(6):1220-4.
- Lindoso JA, Cota GF, da Cruz AM, Goto H, Maia-Elkhoury AN, Romero GAVisceral leishmaniasis and HIV coinfection in Latin America. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(9):e3136
- Lopes JD, Caulada Z, Barbieri CL, Camargo EP. Cross-reactivity between *Trypanosoma cruzi* and insect trypanosomatids as a basis for the diagnosis of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg*. 1981 ;30(6):1183-8.
- Martin SK, Thuita-Harun L, Adoyo-Adoyo M, Wasunna KM. A diagnostic ELISA for visceral leishmaniasis, based on antigen from media conditioned by *Leishmania donovani* promastigotes. *Ann Trop Med Parasitol*. 1998;92(5):571-7.
- Mary C, Faraut F, Drogoul MP, Xeridat B, Schleinitz N, Cuisenier B, et al. Reference values for *Leishmania infantum* parasitemia in different clinical presentations: quantitative polymerase chain reaction for therapeutic monitoring and patient follow-up. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;75(5):858-63.
- McGwire BS, Satoskar AR. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *QJM*. 2014 Jan;107(1):7-14
- Mijiti P, Yuexin Z, Min L, Wubuli M, Kejun P, Upur H. Prevalence and predictors of anaemia in patients with HIV infection at the initiation of combined antiretroviral therapy in Xinjiang, China. *Int J STD AIDS*. 2015;26(3):156-64.

- Mohammadiha A, Mohebali M, Haghghi A, Mahdian R, Abadi AR, Zarei Z, Yeganeh F, Kazemi B, Taghipour N, Akhoundi B. Comparison of real-time PCR and conventional PCR with two DNA targets for detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection in human and dog blood samples. *Exp Parasitol*. 2013;133(1):89-94.
- Momen H, Grimaldi G Jr, Pacheco RS, Jaffe CL, McMahon-Pratt D, Marzochi MC. Brazilian *Leishmania* stocks phenotypically similar to *Leishmania major*. *Am J Trop Med Hyg*. 1985;34(6):1076-84.
- Moreno EC, Gonçalves AV, Chaves AV, Melo MN, Lambertucci JR, Andrade AS. Inaccuracy of enzyme-linked immunosorbent assay using soluble and recombinant antigens to detect asymptomatic infection by *Leishmania infantum*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009;3(10):e536
- Moreno EC, Melo MN, Lambertucci JR, Serufo JC, Andrade AS, Antunes CM, et al. Diagnosing human asymptomatic visceral leishmaniasis in an urban area of the State of Minas Gerais, using serological and molecular biology techniques. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006;39(5):421-7.
- Mukhtar M, Abdoun A, Ahmed AE, Ghalib H, Reed SG, Boelaert M, et al. Diagnostic accuracy of rK28-based immunochromatographic rapid diagnostic tests for visceral leishmaniasis: a prospective clinical cohort study in Sudan. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2015;109(9):594-600.
- Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet*. 2005;366(9496):1561-77.
- Nascimento ET, Moura ML, Queiroz JW, Barroso AW, Araujo AF, Rego EF, et al. The emergence of concurrent HIV-1/AIDS and visceral leishmaniasis in Northeast Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2011;105(5):298-300.
- Nascimento Mdo D, Souza EC, da Silva LM, Leal Pda C, Cantanhede Kde L, Bezerra GF, Viana GM. [Prevalence of infection by *Leishmania chagasi* using ELISA (rK39 and CRUDE) and the Montenegro skintest in an endemic leishmaniasis area of Maranhão, Brazil]. *Cad Saude Publica*. 2005;21(6):1801-7.
- Orsini M, Canela JR, Disch J, Maciel F, Greco D, Toledo A Jr, et al. High frequency of asymptomatic *Leishmania* spp. infection among HIV-infected patients living in endemic areas for visceral leishmaniasis in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2012;106(5):283-8.
- Pace D. Leishmaniasis. *J Infect*. 2014;69 Suppl 1:S10-8.
- Papadopoulou C, Kostoula A, Dimitriou D, Panagiou A, Bobojianni C, Antoniadis G. Human and canine leishmaniasis in asymptomatic and symptomatic population in Northwestern Greece. *J Infect*. 2005;50(1):53-60.
- Pastor-Santiago JA, Chávez-López S, Guzmán-Bracho C, Flisser A, Olivo-Díaz A. American visceral leishmaniasis in Chiapas, Mexico. *Am J Trop Med Hyg*. 2012;86(1):108-14.

- Pastorino AC, Jacob CM, Oselka GW, Carneiro-Sampaio MM.[Visceral leishmaniasis: clinical and laboratorial aspects]. *J Pediatr (Rio J)*. 2002;78(2):120-7.[Article in Portuguese]
- Patil RR, Muliylil JP, Nandy A, Addy A, Maji AK, Chatterjee P.Dynamics of the antibodies in cohorts of cured cases of visceral leishmaniasis: its implication on the validity of serological test, value in prognosis and in post therapeutic assessment. *Hum Vaccin Immunother*. 2012;8(6):725-30.
- Pineda JA, Gallardo JA, Macías J, Delgado J, Regordán C, Morillas F,et al, Prevalence of and factors associated with visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus type1-infected patients in southern Spain. *J Clin Microbiol*.1998;36(9):2419-22.
- Pourabbas B, Ghadimi Moghadam A, Pouladfar G, Rezaee Z, Alborzi A.Quantification of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA for monitoring the response to meglumine antimoniate therapy in visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2013;88(5):868-71.
- Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos. [www.aids.gov.br](http://www.aids.gov.br): Ministério da Saúde do Brasil: 15-17 p. 2015.
- Rangel O, Hiramoto RM, Henriques LF, Taniguchi HH, Ciaravolo RMC, Tolezano JE, et al. Epidemiological classification of cities according to the Program of Surveillance and Control of American Visceral Leishmaniasis in the State of São Paulo, updated in 2013: BEPA, *Bol Epidemiol Paul*. (Online). 2013; 10(111): 3-14. [cited 2017 Feb 22].Available from: [http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1806-42722013000300002&lng=pt](http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-42722013000300002&lng=pt).Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF.
- Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp Parasitol*. 1990;71(3):267-75.
- Santos NJS, Tavra A, Silva SR, Buchalla CM, Laurenti R. A Aids no Estado de São Paulo: as mudanças no perfil da epidemia e perspectivas da vigilância epidemiológica. *Rev Bras Epidemiol*. 2002; 5(3): 286-310.
- Shapiro TA, Englund PT. The structure and replication of kinetoplast DNA. *Annu Rev Microbiol*.1995;49:117-43.
- Shen X, Tomaras GD. Alterations of the B-cell response by HIV-1 replication. *Curr HIV/AIDS Rep*. 2011;8(1):23-30.
- Shivakoti R, Sharma D, Mamoon G, Pham K. Association of HIV infection with extrapulmonary tuberculosis: a systematic review. *Infection*. 2017;45(1):11-21.
- Slutzky GM, Greenblatt CL. Analysis by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of an immunologically active factor of *Leishmania tropica* from growth media, promastigotes, and infected macrophages. *Biochem Med*. 1979;21(1):70-7.

Srivastava P, Dayama A, Mehrotra S, Sundar S. Diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2011;105(1):1-6.

Strathdee SA, Stockman JK. Epidemiology of HIV among injecting and non-injecting drug users: current trends and implications for interventions. *Curr HIV/AIDS Rep.* 2010 May;7(2):99-106.

Stuart K, Brun R, Croft S, Fairlamb A, Gürtler RE, McKerrow J, et. Al, Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J Clin Invest.* 2008;118(4):1301-10.

Sundar S, Reed SG, Singh VP, Kumar PC, Murray HW. Rapid accurate field diagnosis of Indian visceral leishmaniasis. *Lancet.* 1998;21;351(9102):563-5.

Tamayo COC. Avaliação da co-infecção por *Leishmania* em pessoas vivendo com HIV/AIDS acompanhadas no Hospital Universitário de Brasília: estudo transversal com ênfase na leishmaniose visceral [tese]. Brasília: Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília; 2006.

ter Horst R, Tefera T, Assefa G, Ebrahim AZ, Davidson RN, Ritmeijer K. Field evaluation of rK39 test and direct agglutination test for diagnosis of visceral leishmaniasis in a population with high prevalence of human immunodeficiency virus in Ethiopia. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;80(6):929-34.

UNAIDS. Global Aids up date, 2016. [cited 2016 Dec 01]. Available from: [http://www.unaids.org/sites/default/files/media\\_asset/global-AIDS-update-2016\\_en.pdf](http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/global-AIDS-update-2016_en.pdf)

Vaish M, Bhatia A, Reed SG, Chakravarty J, Sundar S. Evaluation of rK28 antigen for serodiagnosis of visceral Leishmaniasis in India. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(1):81-5.

van Griensven J, Diro E. Visceral leishmaniasis. *Infect Dis Clin North Am.* 2012;26(2):309-22.

van Griensven J, Zijlstra EE, Hailu A. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection: time for concerted action. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014, 28;8(8):e3023

World health organization. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. Geneva 2010.

Yehia L, Adib-Houreh M, Raslan WF, Kibbi AG, Loya A, Firooz A, et. al, Molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species identification: analysis of 122 biopsies with varied parasite index. *J Cutan Pathol.* 2012;39(3):347-55.